



**VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ**

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA CHEMICKÁ**

FACULTY OF CHEMISTRY

**ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE**

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**TRANSPORT HUMINOVÝCH LÁTEK DO LISTŮ**

TRANSPORT OF HUMIC SUBSTANCES INTO LEAFS

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

BACHELOR'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

**Michaela Žáková**

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

**prof. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.**

**BRNO 2019**

## Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1366/2018 Akademický rok: 2018/19  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Studentka: **Michaela Žáková**  
Studijní program: Chemie a chemické technologie  
Studijní obor: Spotřební chemie  
Vedoucí práce: **prof. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.**

### Název bakalářské práce:

Transport huminových látek do listů

### Zadání bakalářské práce:

1. Seznámit se s problematikou huminových látek a jejich využití při foliárním hnojení.
2. Seznámit se s možnostmi prostupu těchto látek do listů a metodami studia.
3. Na základě poznatků získaných v předchozích bodech navrhnout metody vhodné ke studiu a provést experimenty.
4. Zhodnotit výsledky experimentů a navrhnout další postup.

### Termín odevzdání bakalářské práce: 24.5.2019:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

-----  
Michaela Žáková  
student(ka)

-----  
prof. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.  
vedoucí práce

-----  
prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## **ABSTRAKT**

Tato bakalářská práce simuluje foliární hnojení listů a popisuje transportní procesy huminových látek. Experimenty byly realizovány pro dvě oblasti. První se zaměřovala na tok skrz rostlinnou kutikulu, jakož to hlavní selektivní bariéru. V druhé následovalo studování transportu huminových látek do listu. Difúzní proces byl vyhodnocen pomocí koncentračního úbytku roztoků lignohumátu, jakož to média nesoucí huminové látky v prostředí roztok-list. Výsledky prokázaly vliv kutikuly na penetraci živin a závislost jejích selektivních vlastností na její kondici. Novými získanými poznatky jsou transportní děje huminových látek do listů, které se ukázaly efektivní již v krátkém časovém úseku, a to převážně při vyšších koncentracích použitého roztoku lignohumátu.

## **ABSTRACT**

This bachelor thesis simulates leaf foliar fertilization and describes transport processes of humic substances. Experiments were performed for two areas. The first focused on the flow through the plant cuticle as the main selective barrier. In the second one the transport of humic substances to the leaf was studied. The diffusion process was evaluated by the concentration loss of lignohumate solutions, which served as the medium of humic substances in the solution - leaf model. The results showed the effect of cuticle on nutrient penetration and its dependence on its condition. New findings are the transfer processes of humic substances into the leaves, that have proved effective in a short period of time, mainly at higher concentrations.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

HUMINOVÉ LÁTKY, FOLIÁRNÍ HNOJENÍ, DIFÚZE, LISTY, KUTIKULY

## **KEY WORDS**

HUMIC SUBSTANCES, FOLIAR FERTILIZATION, DIFFUSION, LEAVES, CUTICLES

ŽÁKOVÁ, Michaela. *Transport huminových látek do listů* [online]. Brno, 2019 [cit. 2019-05-22]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/113548>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Martina Klučáková.

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....

Michaela Žáková

## PODĚKOVÁNÍ

*Na tomto místě bych ráda poděkovala své vedoucí prof. Ing. Martině Klučákové, Ph.D. za ochotu, trpělivost, odborné vedení a věnovaný čas při vypracování bakalářské práce. Dále bych velmi ráda poděkovala Ing. Marcele Smilkové za cenné rady při experimentální práci. Rovněž děkuji své rodině za neustálou podporu při studiu.*

# OBSAH

<b>1. ÚVOD .....</b>	<b>7</b>
<b>2. TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>8</b>
<b>2.1. Huminové látky (HL) .....</b>	<b>8</b>
2.1.1. Huminové kyseliny .....	8
2.1.2. Fulvokyseliny.....	9
2.1.3. Huminy .....	9
<b>2.2. Humifikace .....</b>	<b>10</b>
2.2.1. Ligninová teorie .....	10
2.2.2. Polyfenolová teorie .....	10
2.2.3. Kondenzace sacharidů s aminy .....	10
<b>2.3. Hnojiva .....</b>	<b>10</b>
2.3.1. Rozdělená průmyslových hnojiv .....	11
<b>2.4. Mimokořenová výživa .....</b>	<b>12</b>
2.4.1. Foliární (listový) typ hnojení .....	12
2.4.2. List (phylloma, fylom) .....	12
2.4.3. Kutikula (cuticula) .....	13
2.4.4. Průnik látek kutikulou .....	13
<b>2.5. Transportní děje živin .....</b>	<b>14</b>
2.5.1. Krátká cesta (transport do buněk) .....	14
2.5.2. Střední cesta .....	15
2.5.3. Dlouhá cesta.....	15
2.5.4. Rychlost průniku a mobilita živin .....	15
<b>2.6. Agarózový hydrogel.....</b>	<b>16</b>
<b>2.7. Difúze .....</b>	<b>16</b>
<b>2.8. Současný stav řešené problematiky .....</b>	<b>18</b>
2.8.1. Metody izolace kutikul.....	18
<b>3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>20</b>
<b>3.1. Použité chemikálie při transportu skrz rostlinnou kutikulu .....</b>	<b>20</b>
<b>3.2. Použité chemikálie při transportu do listů .....</b>	<b>20</b>
<b>3.3. Použitá instrumentace .....</b>	<b>21</b>

<b>3.4.</b>	<b>Transport lignohumátu skrz listovou kutikulu .....</b>	<b>21</b>
3.4.1.	Izolace kutikul.....	21
3.4.2.	Příprava difúzního média .....	22
3.4.3.	Aplikace do roztoku .....	23
3.4.4.	Měření .....	24
<b>3.5.</b>	<b>Transport lignohumátu do listů.....</b>	<b>24</b>
3.5.1.	Příprava vzorků listů a roztoků .....	24
3.5.2.	Metoda s odpařováním roztoku.....	26
3.5.3.	Metoda s parafilmem .....	26
<b>3.6.</b>	<b>Diskuze a výsledky měření .....</b>	<b>27</b>
3.6.1.	Příprava vzorků .....	27
3.6.2.	Transport skrz kutikulu .....	27
3.6.3.	Transport do listu .....	30
<b>3.7.</b>	<b>Distribuce velikosti částic .....</b>	<b>34</b>
<b>4.</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>37</b>
<b>5.</b>	<b>ZDROJE.....</b>	<b>39</b>

# 1. ÚVOD

Humus je dnes již neodmyslitelnou součástí intenzivní rostlinné výroby agronomického průmyslu, a i v domácím zahradničení běžná složka hnojiva. Jedná se o základní organickou hmotu užívanou pro zvýšení úrodnosti a zlepšení kondice plodin. Celkový proces vzniku humusu v přírodě je uzavřen v krátkodobých i dlouhodobých cyklech a každý humus si vytváří svůj vlastní režim. Vlivem podnebních podmínek, typu a obsahu půdy se humus tvoří se svým charakteristickým složením a vlastnostmi. Jeho pozitivních účinků na plodiny se využívá již celá staletí. Avšak v dnešní době, kdy je půda neustále obhospodařovaná zemědělci a průmyslem, přirozená tvorba humusových látek „nestíhá“ a zásoba humusu je pro aktuální situaci nedostatečná. Proto doplňování organického humusu do půdy, nebo i jiného syntetického zdroje živin se stává nutností všech pěstitelů a zemědělců ve všech vyspělých zemích.

Huminové látky jsou polyfenolové sloučeniny, které se v humusu přirozeně vyskytují a jsou hlavním nosičem nutrientů pro rostliny. Nejvyšší složku tvoří huminové kyseliny, které mají na ochraně, výživě a růstu rostliny svůj značný podíl. Kromě huminových kyselin jsou v humusu obsaženy i fulvinové kyseliny a huminy. Jejich poměr, skupenství a původ mají velký vliv na celkové vlastnosti humusu, ve kterém jsou obsaženy.

Mohou se vyskytovat jak v pevném skupenství, tak i jako součást koloidních a reálných roztoků. Díky tomu je možné je aplikovat ve více formách a optimalizovat tak celý proces hnojení. V této práci se zaměřujeme na látky obsažené v roztoku a nanášené přímo na listy, mluvíme zde o tzv. foliárním hnojení, které je nejúčinnější metodou mimokořenové výživy. Jedná se o výživu doplňkovou, která sice nenahradí výživu od kořene, ale pro úpravu vývinu rostliny je velice významná a rozmach jejího využívání již řadu let narůstá.

Teoretická část bakalářské práce se zaměřuje na seznámení se s benefity, které huminové látky rostlině přináší, se základním rozdělením hnojiv, jakož to zdroje huminových látek a se samotnými transportními procesy, kterých rostlina využívá pro příjem nutriční výživy. Neboť zásadou každého hnojení je potřeba znát nejen vlastnosti a nároky pěstovaných plodin, ale i schopnost transportu jednotlivých látek na místo potřeby a účinnost aplikovaných prostředků.

V experimentální části se využívá dvou způsobů, jak je možné transport studovat a simulovat tak reálné podmínky foliární aplikace hnojiv. Nejdříve byla pozorována difúze huminových látek skrz rostlinnou kutikulu, jakož to bariéru, která celý příjem živin řídí. Kutikula byla separována od mezofylu a vložena na rozhraní roztok-gel. Experiment dále sledoval, jakým způsobem kutikula ovlivňuje difúzi řízenou koncentračním gradientem, tak jako ji ovlivňuje při příjmu živin. Jelikož dané měření probíhala bez přítomnosti ostatních složek listu a vodivých pletiv rostliny, zaměřila se druhá část práce právě na transport do prostoru celého listu. Roztok byl aplikován přímo na list a bylo pozorováno množství huminových látek transportovaných do listového mezofylu. Pro zmíněná měření byla využita UV-VIS spektrofotometrie, díky které bylo možné difúzní procesy popsat a navzájem mezi sebou porovnat.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1. Huminové látky (HL)

Organické látky rostlinného i živočišného původu obsažené v půdě se po čase rozkládají a tvoří humus. Složení této tmavé amorfnní hmoty je velice rozmanité, liší se jak svým obsahem původních organických látek, tak i díky biologickým a fyzikálním vlivům, kterým je půda vystavena. Jeho základ tvoří primární organická hmota a huminové látky, které vznikají různými rozkladnými a syntetickými procesy při tzv. humifikaci. [1]

Humifikace zahrnuje biochemické transformace a aerobní či anaerobní rozklad rostlinných biopolymerů. Na tvorbě se podílí celá řada látek, které je činí tak různorodými. Jedná se o látky jako sacharidy, bílkoviny, tuky, vosky, lignin aj. Při humifikaci dochází k jejich syntézám a jejich poměr a množství ovlivňují vlastnosti humusu.[1][2]

HL jsou vysokomolekulární sloučeniny tmavě hnědého zbarvení, složené primárně z C, O, H a N. Spadají do skupiny přírodních látek zvané polyfenoly. Vyskytují se nejen v půdě, ale i dnových sedimentech nebo rašelinách, kde tvoří až 50 % jejich obsahu. Sloučeniny jsou převážně aromatické s uhlíkovou kostrou a velkým množstvím navázaných postranních řetězců s funkčními skupinami. Jak již bylo řečeno, struktura huminových látek je velmi rozmanitá a zastoupení skupin na bočních řetězcích nemá svá specifická pravidla. Vyskytují se zde jak aromatická jádra, tak chinoidní struktury, nebo deriváty heterocyklických sloučenin.[1]

Jsou zdrojem uhlíku a nosičem výživových látek pro rostliny. Také jsou schopny na sebe vázat polutanty, a tak před nimi rostlinu chránit. Jejich chování závisí především na uspořádání funkčních skupin a jakým způsobem jsou na sebe vázány.[2]

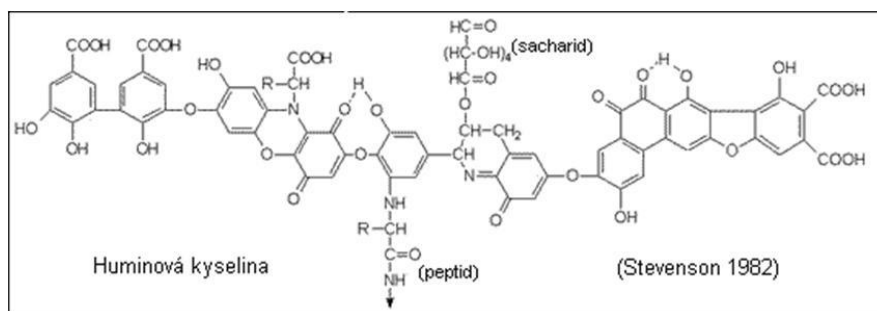
Dělení HL je založeno na jejich fyzikálních a chemických vlastnostech. Základním rozlišením je rozpustnost HL v kyselém či alkalickém prostředí. Ta je dána navázanými substituenty. HL jsou rozděleny do tří podskupin na huminové kyseliny, fulvokyseliny a huminy.[3]

#### 2.1.1. Huminové kyseliny

Považovány za nejkvalitnější skupinu huminových látek v půdě. Mají rozmanitý okruh funkcí. Jak poutání vody nebo polutantů, tak ovlivňování biologické aktivity půdy, jejího vodního a tepelného režimu nebo napomáhání výživě a růstu rostlin.

Jedná se o tmavě hnědé heterogenní sloučeniny dobře rozpustné v ethanolu a roztocích hydrolyticky zásaditých solí, ale ve vodě jen velmi málo či vůbec. [3] Charakteristické funkční skupiny jsou karboxylová a hydroxylová, které jsou příčinou jejich kyselého charakteru. Dusík je součástí heterocyklů i alifatických postranních řetězců.[1][3]

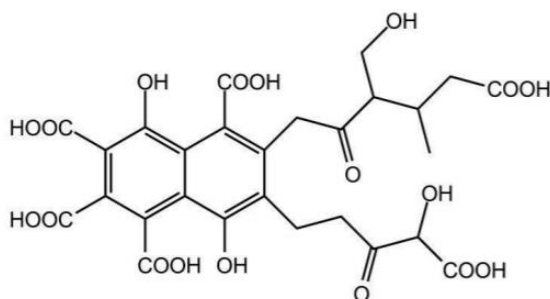




Obr. 1: Huminová kyselina [23]

### 2.1.2. Fulvokyseliny

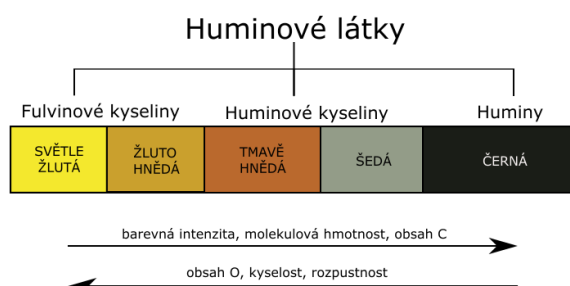
Oproti HK se jedná o látky v kyselém roztoku velmi dobře rozpustné, i když svojí strukturou jsou si velmi podobné. Liší se především svojí menší velikostí a molekulovou hmotností. Obsahují zejména uhlík a kyslík, a to u obou až do 49 %.[4] Rozpustné jsou především ve vodě, louhu a minerálních kyselinách. Ve vodě dobře disociují a mají kyselější charakter než HK.[1] Díky jejich nižší hmotnosti a rozpustnosti jsou poměrně pohyblivé a z půdy se snadno vyplavují. Jejich zastoupení v půdě je tudíž nižší. [2][3]



Obr. 2: Fulvinová kyselina [23]

### 2.1.3. Huminy

Jsou nerozpustné organické zbytky bez obsahu většího množství funkčních skupin. Jedná se o poměrně inertní formu organického hmoty s vysokou hmotností, která je pevně vázána k minerální složce půdy a její význam v půdě a zemědělství je minimální. [1][4]



Obr. 3: Rozdělení huminových látek a jejich vlastnosti (převzato z [23])

## **2.2. Humifikace**

Rozkladu organických látek dominuje jejich mineralizace, kdy ze složitých sloučenin vznikají sloučeniny jednodušší. Velká část experimentálních prací, jak zmiňuje Sotáková ve své publikaci [5] dokládá, že pouze 20–25 % hm rostlinných zbytků podléhá humifikaci. Proces vzniku HL zahrnuje složité několikafázové chemické procesy organických zbytků a rostlinných biopolymerů (ligninu, vosků, fenolových kyselin aj.), které nejsou dodnes dostatečně objasněny. Víme, že dochází k transformaci a degradaci původních biopolymerů a k syntéze nových převážně dusíkatých makromolekul s odlišným chemickým složením. [3]

Humusotvorného procesu se účastní mikroorganismy, enzymy a další činitelé jako voda, světlo, O<sub>2</sub> apod. Bez jejich přítomnosti k humifikaci (ani mineralizaci) nedojde a na řadu by přišly procesy jako rašelinění nebo uhelnatění. [5]

I když vznik huminových látek nám stále není dostatečně znám, existují pro něj tři základní teorie.

### **2.2.1. Ligninová teorie**

První teorie považuje za hlavní výchozí látku lignin, vysokomolekulární rostlinný biopolymer, v přírodě vysoce zastoupený. Ten podléhá mikrobiální degradaci, dochází ke značným změnám struktur a oxidačními procesy k tvorbě karboxylových skupin. Až po těchto reakcích dochází k tvorbě huminů, následně huminových kyselin a na závěr kyselin fulvinových.

### **2.2.2. Polyfenolová teorie**

Je další teorií, která nahradila původní, ligninovou teorii a je dodnes uznávanou hypotézou. Soustředí se na základní stavební jednotky HL, a to polyfenoly, které jsou syntetizovány pomocí mikroorganismů. Rostlinné biopolymery se nejdříve rozloží na základní strukturní jednotky, kdy oxidace na polyfenoly a chinony probíhá na postranních řetězcích. Vzniklé sloučeniny reagují s dusíkatými látkami za vzniku huminových látek. Tentokrát jako první vznikají fulvinové kyseliny, a naopak huminy se tvoří až jako finální produkt.

### **2.2.3. Kondenzace sacharidů s aminy**

Další možností tvorby HL za pomoci mikroorganismů je nepřímou cestou. A to metabolickými procesy rozkládající polysacharidy a proteiny na cukry a aminokyseliny, ale dále se procesu humifikace již neúčastní. Reakcí cukrů s aminokyselinami vznikají glukosylaminy, ze kterých jsou přeskupením a polymerací syntetizovány HL. [6]

## **2.3. Hnojiva**

Humus je organickým hnojivem, které je dnes základem pro udržení a zlepšení půdní úrodnosti. Přírodními zdroji mohou být hnůj, kompost, sláma, močůvka apod. Dodávají plodinám potřebné živiny jako je dusík, fosfor nebo draslík. Avšak pro dnešní úrodnou půdu se již neobejdeme bez průmyslově syntetizovaných hnojiv, neboť půda nedokáže být poskytovatelem stálého zdroje humusu. [5][7]

### **2.3.1. Rozdělená průmyslových hnojiv**

Průmyslová hnojiva se rozdělují podle jejich hlavní výživové složky.

#### **2.3.1.1. Dusíkatá**

Hlavní složkou je dusík, nezbytný pro růst rostlin. Ovlivňuje tvorbu biomasy, je součástí aminokyselin, nukleových kyselin nebo chlorofylu. Výroba využívá převážně vzdušného N<sub>2</sub> a ropy. Deficit způsobuje rychlé dozrávání plodin, které dorůstají malých rozměrů o nižší kvalitě. Při nadbytku rostlina roste výrazně rychleji, což může mít negativní vliv na její obranyschopnost. Proto určení správné dávky je poměrně obtížné a pro každou rostlinu individuální. Zvláště významné jsou zde nitrátová hnojiva, kam řadíme hojně využívané ledky, nebo hnojiva s amonným (čpavek) či amidovým dusíkem (močovina).

#### **2.3.1.2. Fosforečná**

Hnojiva dodávající rostlinám makrobiogenní fosfor, nezbytnou látku pro tvorbu fosfolipidů, nukleoproteinů, nukleových kyselin, tedy je součástí buněčných membrán a jader. Jeho hlavní funkcí je přenos energie v metabolických reakcích jako je fotosyntéza, dýchání, katabolické reakce cukrů, tuků bílkovin aj. Fosforečná hnojiva dělíme především podle jejich rozpustnosti, jejich zástupci jsou především fosfáty.

#### **2.3.1.3. Draselná**

Draslík je rostlinou přijímán ve velké míře, příznivě ovlivňuje příjem iontů, vodní režim, tlak v buňkách, syntézu bílkovin a chlorofylu nebo zvyšuje obranu proti chorobám či suchu. Při nedostatku listy vadnou a žloutnou. Draslík je v hnojivech vázán na příslušné anionty, podle kterých je rozdělujeme na hnojiva např. chloridová (chlorid draselný) nebo síranová (síran draselný).

#### **2.3.1.4. Vápenatá**

Zdrojem Ca potřebného pro tvorbu kořenů a pro metabolické procesy v celém těle rostliny. Při nedostatku prvně hynou kořeny rostliny a stonek a mladé listy kropenatí. Vápník se v hnojiva nachází v různých formách, jako je vápenec, pálené vápno či síran vápenatý.

#### **2.3.1.5. Hořečnatá**

Čistě hořečnatá hnojiva nejsou tolik zastoupeným výrobkem, neboť se hořčík využívá i do ostatních hnojiv jako příměs k zamezení jeho častému deficitu. Má nenahraditelnou roli v těle rostliny. Nachází se v jádře chlorofylu, mitochondriích či buněčných stěnách a ovlivňuje metabolismus. Při deficitu se snižuje schopnost fotosyntézy a tvorby cukrů, bílkovin i chlorofylu. Hnojiva se užívají jak tuhá, tak i kapalná nejčastěji se síranovou nebo oxidovou formou hořčíku.

#### **2.3.1.6. Vícesložková**

Jedná se o kombinaci zmíněných živin v hnojivu. Důležitým faktorem je zde poměr jednotlivých složek. Pozitivním výsledkem je větší různorodost fyzikálních i chemických vlastností i ekonomicky výhodnější aplikace.

#### **2.3.1.7. Speciální**

Hnojiva obsahují mikroelementy a slouží ke speciálním účelům podle požadavků konkrétních vyživovaných rostlin. [7][9]

## 2.4. Mimokořenová výživa

Rostliny mohou přijímat minerály jak kořeny, tak všemi svými nadzemními vegetativními orgány. Základní překážkou příjmu živin pro listy je kutikula, která brání průniku látek. Mimokořenová výživa je nejen přísunem živin, ale má i pozitivní vliv na metabolismus a stárnutí rostliny.[10]

### 2.4.1. Foliární (listový) typ hnojení

Už víme, že hnojení (fertilizace) je pro plodiny i jiné rostliny významným krokem. Za původní způsob hnojení považujeme přímé zavedení hnojiva do půdy, to se vlivem vláhy rozpouští a poskytuje výživu přímo u kořene rostlin. Avšak jen částečné množství nutrientů je rostlinou využito, zbytek je odplaven pryč.

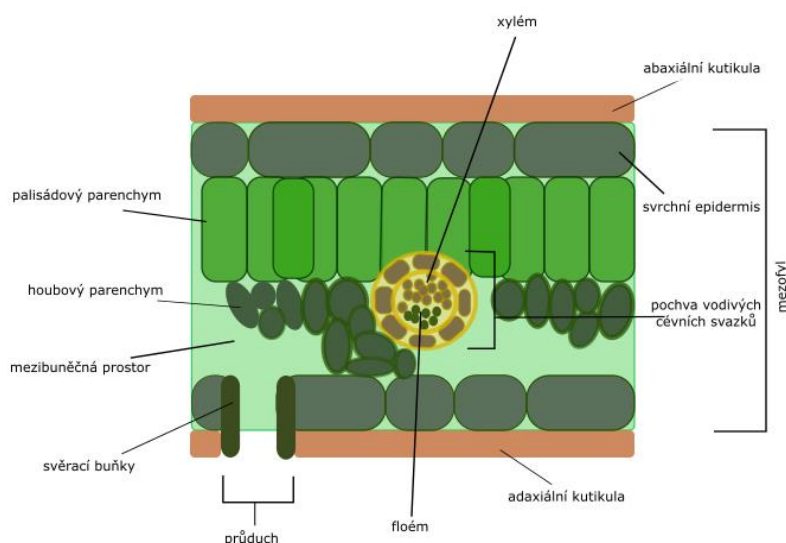
Dnes je k zavádění hnojiva do půdy i velice využívaná metoda tzv. foliárního hnojení. Směs výživových látek je převedena do roztoku a ve formě postřiku je aplikována na listy rostlin. Dochází k příjmu živin skrz kutikulu a jejich dalšímu transportu do buněk nebo těla rostliny. Jedná se o velice efektivní hnojení, koncentrace a dávkování roztoků je možné volit podle potřeby a je zde možnost i přimíchávání herbicidů. Díky tomu můžeme získat plodiny o kvalitě, které bychom pouhým kořenovým hnojením nedosáhli.

Ale i při foliárním hnojení dochází ke ztrátám živin, které se po vyschnutí usazují na listu. Povětrnostní podmínky nebo průtrže mračen jsou další ovlivňující faktory pro výživu, se kterými musí zemědělci počítat. [10][11]

### 2.4.2. List (phylloma, fylom)

Orgán vyrůstající ze stonku rostlin tvořený čepelí a řapíkem. Mezi jeho nejdůležitější funkce patří asimilace  $\text{CO}_2$ , absorpce slunečního záření, transpirace, respirace, a také mimokořenová výživa rostliny. Vnitřní stavba je více komplikovanější a je často určena fyziologickou funkcí listu.

Povrch listu tvoří pokožka (epidermis), která je krytá kutikulou a uvnitř se nachází pletiva nazývaná mezofyl.



Obr. 4: Průřez vnitřní stavby listu (převzato z [9])

Na obrázku vidíme pokožku tvořenou jednou vrstvou epidermis, která je krytá kutikulou. (výjimkou jsou kapradiny a ponořené vodní rostliny, které kutikulu nemají). Mezofyl je základní pletivo, které tvoří prostor mezi svrchní a spodní stranou listu. [9] Je tvořen především parenchymatickým pletivem s chloroplasty, jeho hlavní funkcí je fotosyntéza. [12]

#### **2.4.3. Kutikula (cuticula)**

Ke sledování průchodu živin do listu je třeba se zaměřit na hlavní transportní bariérou, která tvoří ochrannou vrstvu mezi rostlinou a jejím okolím. Umožňuje vstřebání živin do listu, a naopak brání průniku patogenů. Kutikula je tvořena na povrchu voskovitým biopolymerem kutinem a dalšími kutikulárními hydrofobními vosky a mastnými kyselinami, které snižují propustnost vody a plynů. I když je spíše lipofilní povahy, obsahuje menší množství například hydrofilní karboxylové skupiny, dále polysacharidy celulózu a pektin, díky nimž kutikula ve vlhku bobtná, mění svoji celistvost a umožňuje lepší průchod vody nesoucí živiny. Důležitou součástí jsou stomata umožňující regulovat výměnu plynů ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{SO}_2$  aj.). Ale funkce přijímat živiny je u průduchů omezená. Jsou umístěny pouze na spodní straně listů a tvořeny dvěma svěracími buňkami se štěrbinou. [9][14] U starších listů se zhoršuje jejich propustnost pro vodu, což má za následek omezenou schopnost přijímat živiny. [11][13]

#### **2.4.4. Průnik látek kutikulou**

Je pasivním procesem řízeným samovolným vyrovnáváním koncentrací v prostředí s koncentračním gradientem (popis děje v kapitole Difúze). Předpokládá se, že látky mohou procházet kutikulou buď lipofilní cestou, nebo polární. Různé pesticidy a herbicidy mají většinou lipofilní charakter, a proto využívají lipofilní cesty. Naproti tomu živiny jsou polární iontové sloučeniny a prochází tzv. polární cestou obalené v hydratačním obalu.

Při příjmu živin do listu dochází k několika fázím. Nejdříve se list zvlhčí nanesením hnojiva, kutikula bobtná a dojde k průniku látky skrz kutikulu a stěnu epidermis do volného listového prostoru a apoplastu. Živiny se pasivně pohybují mezofylem, nebo jsou aktivně přijímány do listového symplastu (propojené části sousedních buněk, tvořící jednu z cest pro živiny). Živiny jsou distribuovány uvnitř celého listu i rostliny, metabolizovány nebo ukládány. [14] Ty, které jsou přijímány foliární cestou se zpravidla v listu hromadí a není potřeba je dopravovat pomocí pletiv z kořenových částí rostliny. [13] Pletivo umožňující přenos živin a dalších organických látek z listu na místo potřeby se nazývá floém (lýko). Celý transport živin je spojení svazkového (pletivo) a mimosvazkového (symplast, apoplast) transportu všech buněk do orgánů rostliny k jejich spotřebě nebo k uložení rezerv. (viz Transportní děje živin) [15][16]

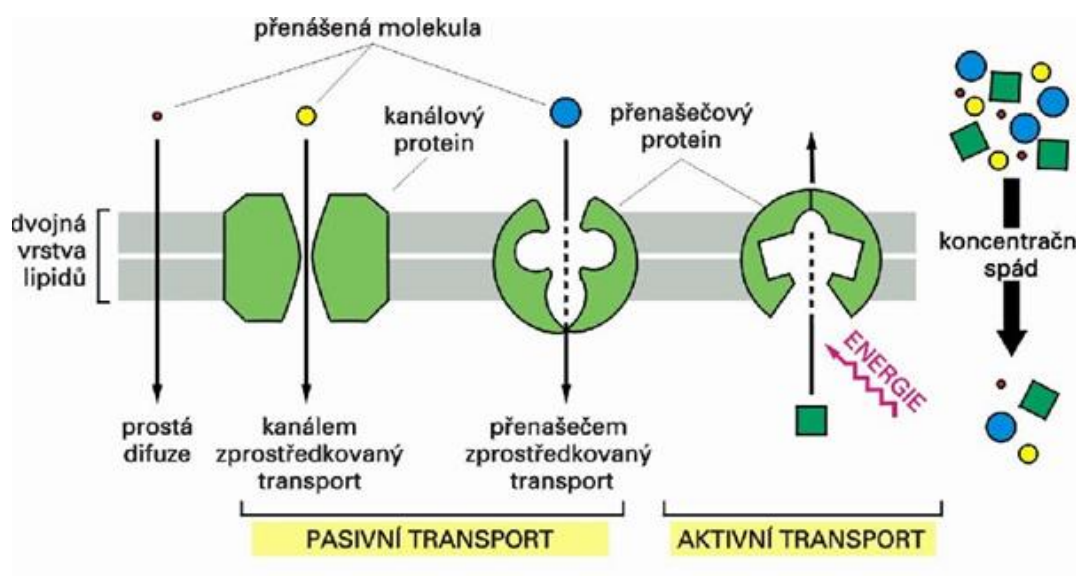
## 2.5. Transportní děje živin

Látky v rostlinách po průchodu skrz kutikulu mohou být transportovány na různé vzdálenosti. Delší vzdálenost představuje meziorgánový transport, ke kterému rostlina využívá vodivá pletiva. Naopak kratší cestou je přenos látek do buněk a jejich struktur.

### 2.5.1. Krátká cesta (transport do buněk)

K transportu dochází jak mezi jednotlivými buňkami, tak i uvnitř buněk. Podle toho, zda je způsoben prostou difúzí, či vyžaduje spotřebu energie, je rozdělován na aktivní a pasivní transport. [15]

Pro transport je rozhodujícím faktorem *buněčná stěna*, tvořená fosfolipidovou dvojvrstvou, která selektivně propouští látky podle velikosti. Proto jí mohou procházet jen molekuly menších rozměrů jako  $O_2$ ,  $CO_2$ , částečně voda. K přenosu větších molekul skrz membránu slouží především bílkovinné transportéry, většinou specifické pro daný substrát.[24]



Obr. 5: Transportní mechanismy na membráně [16]

Tyto mechanismy zprostředkovávají například proteinové kanály, které slouží jako selektivní pór (přenáší molekuly, jako jsou např. monosacharidy, minerální živiny apod.), nebo proteinové přenašeče, schopné se lipidovou membránou pohybovat (přenáší např.  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ). [15]

Základním principem dějů je navázání se látky na protein, který ji přeneseme na druhou stranu membrány. Látka se uvolní na opačné straně membrány a protein změní svou konformaci do původní podoby. [15][20]

Příjem živin do jednotlivých organel funguje na stejném principu, jako do samotné buňky. Opět dochází k průniku skrz membránu, kdy každá má své specifické přenašečové proteiny, a tak určí, které látky se do dané organely dostanou. [24]

*Prostá difúze* je nespecifický průnik, kdy mohou nepolární látky projít fosfolipidovou dvojrůstvou bez příslušného přenašeče (již zmíněný kyslík, voda) pomocí koncentračního spádu. [16]

### 2.5.2. Střední cesta

Zde se jedná o poměrně nenáročný transport v listovém symplastu pomocí plazmodezma (kanál v buněčné stěně propojující sousední buňky).

### 2.5.3. Dlouhá cesta

Při přepravě živin na delší vzdálenosti využívá rostlina vodivých pletiv: *xylém* a *floém*. Xylém slouží jako cesta živin od kořene, jelikož se jedná o kořenovou výživu, nebudeme se tu touto cestou podrobněji zabývat.

Oproti tomu floém může fungovat různými směry. Slouží k dodání asimilátů, vody, organických i anorganických látek. Spolu s xylémem tvoří v listech cévní svazkovou síť zvanou žilnatina. Krom vodivé funkce slouží i jako zpevnění a zásobárna listu. [9][24]

### 2.5.4. Rychlost průniku a mobilita živin

Rychlost a efektivita příjmu živiny je značně ovlivněna anatomickými a fyziologickými faktory rostliny, stavem prostředí, plochou listu, koncentrací živiny nebo množstvím aplikovaného hnojiva. Např. vzdušná vlhkost nebo vyšší teplota mají kladný vliv na průchod kutikulou.

Mobilita jednotlivých látek se liší. Mezi pohyblivé živiny, které si rostlina dopraví na místo potřeby patří např. N, P, K, Mg. Naopak méně pohyblivé, které rostlina vyžaduje absorbovat přímo na místě využití jsou např. Mn, Fe, Cu.

Pokud rostlina strádá, její příjem je rychlejší a účinnější než u rostlin, které mají živin dostatek. [13]

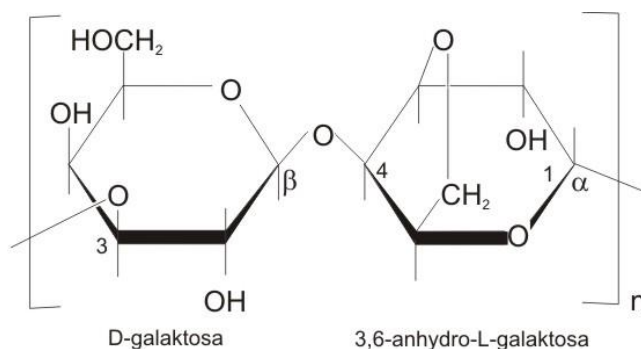
Tabulka 1 Doba potřebná k adsorpci 50 % z aplikovaného množství živiny (Hudská 1976)

živiny	doba absorpce
N v močovině	0,5 až 2 hod
Mg	2-5 hod
K	10 až 24 hod
Ca, Mn, Zn	1-2 dny
P	5-10 dní
Fe, Mo	10-12 dní

## 2.6. Agarózový hydrogel

Gely patří mezi koloidní disperze pevné látky v kapalném prostředí, tvořící souvislou trojrozměrnou síť. I když disperzním prostředím je kapalina, gel vykazuje určité vlastnosti pevných látek. Pro náš výzkum představují velký význam, neboť se v rostlinách často vyskytují. Agaróza je polysacharid tvořený lineárními řetězci galaktózy, splétající se do nadšroubovicových struktur o velikosti 20 – 30 nm. Pro náš výzkum mají gely velký význam, neboť se jedná o formu často vyskytující se v rostlinách a je vhodným difúzním médiem [25]

Pro transport huminových látek v gelu, je důležitým parametrem jeho pórovitost, tímto problémem se zabývá diplomová práce *Transportní vlastnosti agarózových hydrogelů* [22]. Stanovená velikost průměru pórů 1% (hm.) agarózového gelu je 0,18  $\mu\text{m}$ .



Obr. 6: Monomerická jednotka polysacharidu agarózy [21]

Agaróza má teplotu tání 85 °C a v horké vodě se snadno rozpouští. Pokud zahřátý roztok ochlazujeme, dochází k jeho zesítnění a vzniku termoreverzibilního gelu [8]

## 2.7. Difúze

Difúze je proces nastávající při styku dvou různých koncentrací téže látky v jednom prostředí. Jedná se o transportní děj, kdy dochází ke snaze vyrovnání koncentrací a vzniku koncentračního gradientu. Rychlost procesu závisí na mnoha faktorech, jako je teplota, tvar a velikost difundujících částic nebo dynamická viskozita difúzního média. Tyto vlastnosti vyjadřujeme pomocí základní konstanty, tzv. *difúzní koeficient*. Vztah mezi hustotou difúzního toku, koncentračním gradientem a difúzním koeficientem je vyjádřen pomocí *Prvního Fickova zákona*:

$$J_A = -D \left( -\frac{\partial c_A}{\partial x} \right) \quad (1)$$

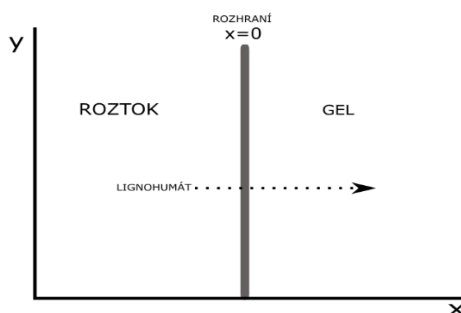
kde  $J_A$  je hustota difúzního toku složky A (lignohumátu),  $D$  je difúzní koeficient (záporné znaménko představuje difúzi ve směru klesající koncentrace) a  $(-\partial c_A/\partial x)$  je koncentrační gradient kolmý k difúznímu rozhraní.



První Fickův zákon charakterizuje ustálený difúzní tok, kdy se koncentrace s časem nemění. Pro definici neustálené difúze využíváme *Druhého Fickova zákona*, který umožňuje rozdělení koncentrace v závislosti na vzdálenosti  $x$  a čase  $t$ :

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2}, \quad D \neq D(c) \quad (2)$$

Pro výpočet toku využíváme případu *difúze z páru nekonečných médií*:



Obr. 7: model difúzního rozhraní

*Počáteční podmínky difúzního procesu:*

V čase  $t = 0$  hod předpokládáme pro oblast  $x < 0$  (roztok) hodnotu koncentrace LH rovnou počáteční koncentraci roztoku  $\rightarrow c = c_0$ .

V čase  $t = 0$  hod předpokládáme pro oblast  $x > 0$  (gel) hodnotu koncentrace LH rovnou nule  $\rightarrow c = 0$ .

*Podmínky v čase  $t > 0$ :*

Víme, že difúzní toky jednotlivých médií se musí rovnat. Tedy množství lignohumátu transportované z roztoku se musí shodovat s množstvím, které bylo přijato do gelu, případně listu:

$$J_1 = J_1 \quad (3)$$

Koncentrace na rozhraní fází (v bodě  $x = 0$ ) je v čase konstantní  $\rightarrow c_r = \text{konst.}$

V takovém systému je pak koncentrace v místě  $x$  a čase  $t$  rovna vzorci:

$$c(x, t) = c_r \cdot \operatorname{erfc} \frac{x}{2\sqrt{D_g t}} \quad (4)$$

Kde  $c_r$  je koncentrace roztoku na rozhraní, a  $D_g$  je difúzní koeficient gelu.

Celkový tok pak je možné vyjádřit jako množství lignohumátu prošlého rozhraním o jednotkové ploše za čas podle rovnice:

$$m_{LH} = 2 \cdot c_r \cdot \sqrt{\frac{D \cdot t}{\pi}} \quad (5)$$

Výsledný tok byl hlavním parametrem pro popis difúze z páru nekonečných médií v závislosti na čase  $t$ . [28][29][30]

## 2.8. Současný stav řešené problematiky

Schopnost příjmu huminových látek rostlinami je cílem zkoumání již v několik, ať už se zaměřením čistě na kvalitu půdy a schopnost výživy skrz kořeny, tak s přibývajícím snahou vylepšovat zemědělské podmínky i na foliární výživu.

Příkladem je výzkumná práce z Teheránské univerzity, zabývající se foliární aplikací huminových kyselin na řepku. [26] Kyselina byla aplikována pomocí spreje na rostlinu v koncentracích 0,1, 1, 1,5 a 2 % (hm.). Výsledky ukázaly, že listová aplikace výrazně ovlivnila velikost vzrůstu rostliny, především u 2% (hm.) roztoku huminové kyseliny. Jako další zajímavý ukazatel bylo pozorováno snížení příjmu dusíku z půdy, což představuje pozitivní vyhlídky na omezení užívání dusíkatých hnojiv a zanášení tím půdy.

Dalším příkladem je práce [27] studující vliv foliárního hnojení na sucho a tepelný stres jabloně a hrušky, pro zefektivnění jejich výnosu. Během tříletého experimentu byly aplikovány živiny a regulátory růstu. Bylo zjištěno, že výživa listu snižuje negativní vliv tepelného stresu a stabilizuje funkční stav rostlin. Během nejtěžšího období sucha, byl pomocí foliární výživy významně zvýšen obsah udržené vody ve srovnání s neošetřenými vzorky.

### 2.8.1. Metody izolace kutikul

Kutikula je tenká hydrofobní vrstva na povrchu listu. Ke sledování experimentu ji bylo potřeba separovat od ostatních složek listu čistou a nepoškozenou. K tomu byly navrženy speciální metody:

#### 2.8.1.1. Enzymatická izolace

##### *Metoda W. H. Orgella:*

Metoda, využívající k rozkladu enzymy pektinázu a celulázu byla vypracována ve vědecké práci [17] využívala prostředí 0,1 M acetátového pufru o  $pH = 3,4$  až  $4,5$ . Pektináza (v 2 až 3 hm.%), která díky své rychlosti a efektivitě rozkládání buněčných struktur byla zvolena za nejvýhodnější aktivní látku. Růst mikroorganismů byl potlačen přidavkem Merthiolatu (100 ppm) a činnost celé izolace byla zvýšena temperací vzorku na  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ , zavedením přerušovaného vakua a rotační třepačky ve frekvenci 100 ot./min. Experimenty probíhaly v rozmezí 12 hod až 3 dnů. Po rozkladu mezofylu byly kutikuly očištěny.

### ***Metoda L. Schreibera aj. Schönherra:***

Vědecká práce [18] využila upravené verze metody W. H. Orgella, kterou ještě doplnila. Jako tlumivý roztok zde použili 0,1 M roztok kyseliny citronové a citrátu sodného. Hodnota pH byla upravena na 3-4 a zvýšila se tak účinnost enzymů. Na inhibici množení se mikroorganismů byl použit azid sodný (koncentrace výsledného roztoku 0,001 M) a v posledním kroku byla přidána pektináza (1-2 hm.%). Při experimentech využitím směsi pektinázy a celulózy bylo dosaženo stejným výsledkům a metoda se tak stala méně ekonomicky náročná. Pro průchodnost enzymů až ke středům listu bylo využito přerušovaného vakua a teploty vzorku na 30 až 40 °C. Po dvaceti denní izolaci bylo možné odumřelý mezofyl odstranit a kutikuly byly uloženy do deionizované vody.

#### ***2.8.1.2. Chemická izolace***

Chemická izolace z práce skupiny vědců [19] je mnohem agresivnější metodou. V experimentu se odlišily dvě strany kutikul, jedna abaxiální, která se nachází na spodní straně listu a na adaxiální, tedy stranu svrchní. Experimentem byly zjištěny rozdíly v propustnosti těchto dvou stran, kdy spodní kutikulou se stomaty prochází látky rychleji. Postup se skládal nejdříve z přípravy izolačního roztoku (60% roztoku  $\text{ZnCl}_2$  rozpuštěného v koncentrované HCl), do kterého byly listy vloženy. Izolace probíhala 2 až 3 dny. Následně byly kutikuly očištěny od mezofylu pomocí špachtle namočené do roztoku streptomycinu. Na závěr byly kutikuly zkontrolovány pod mikroskopem, zda nebyly poškozeny a tím i znehodnoceny.[8]

### 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Experiment se skládá ze dvou částí. V první byl sledován přenos HL skrz kutikulu listu z roztoku do agarózového gelu. Spektrofotometrickým měřením bylo možné sledovat změnu absorpance gelu vlivem jeho obohacování se o lignohumát (dále jen LH). Druhá část je zaměřena na transport HL přímo do prostoru listu. Snahou o simulaci skutečných podmínek byly vybrány dva způsoby, jakým daný transport realizovat.

#### 3.1. Použité chemikálie při transportu skrz rostlinnou kutikulu

##### Enzymatická izolace

chemikálie	čistota	výrobce
kyselina citronová	99,5 %	Sigma-Aldrich
citrát sodný	99,5%	Sigma-Aldrich
pektináza	p.a.	Sigma-Aldrich
celuláza	p.a.	Sigma-Aldrich
azid sodný	p.a.	Sigma-Aldrich

##### Chemická izolace

chemikálie	čistota	výrobce
chlorid zinečnatý	97,0 %	Sigma-Aldrich
kyselina chlorovodíková	99,0 %	Sigma-Aldrich

##### Příprava agarózového hydrogelu

chemikálie	čistota	výrobce
agaróza	p.a.	Sigma-Aldrich

##### Příprava roztoku lignohumátu

chemikálie	čistota	výrobce
lignohumát	-	Amargo s.r.o.

#### 3.2. Použité chemikálie při transportu do listů

##### Příprava formy

chemikálie	čistota	výrobce
ViaFix Powder	-	Struers
ViaFix Liquid	-	Struers

##### Příprava roztoku lignohumátu

chemikálie	čistota	výrobce
lignohumát	-	Amargo s.r.o.

### 3.3. Použitá instrumentace

UV-VIS spektrometr Varian, Cary 50

optický mikroskop Nikon Eclips Ci

vícemístná míchačka Poly 15

UV-VIS spektrometr Hitachi U3900

Zeta Sizer Nano ZS

### 3.4. Transport lignohumátu skrz listovou kutikulu

#### 3.4.1. Izolace kutikul

K experimentu skrz kutikulu bylo potřeba ji separovat a očistit od ostatních složek listu. Při tomto procesu se využilo dvou již ověřených metod, převzatých z diplomové práce *Transport huminových látek skrz rostlinnou kutikulu* [8]. Stejně tak byl touto prací inspirován výběr listu.

List: *Bobkovišeň lékařská* (*Prunus laurocerasus*), vyhovující svou mechanickou odolností jak samotného listu, tak i jeho kutikuly.

##### 3.4.1.1. Enzymatická izolace

Izolace využívá rozkládajících enzymů pektinázy s celulázou, pufru a konzervační látky azidu sodného.

Základním faktorem bylo vybrat vyhovující listy, které nebyly příliš mladé ani staré, nebyly poškozené či napadené. Takové listy byly důkladně očištěny v destilované vodě. Odříznutím hlavní středové žily a okrajů byly získány dvě listové plochy, které byly uloženy do nádoby pro následující separaci.

Dalším krokem byla příprava citrátového pufru. K 1 dm<sup>3</sup> destilované H<sub>2</sub>O bylo přimícháno 3,11 g kyseliny citronové a 1,5 g citrátu sodného. Poté bylo k 45 cm<sup>3</sup> toho pufru přimícháno po 2,5 g pektinázy a celulázy a izolační roztok se zakonzervoval 5 cm<sup>3</sup> NaN<sub>3</sub>.

Výsledný izolační roztok byl nalit do nádoby s připravenými listy. Aby se zabránilo vyplavání listů na hladinu, byly zatíženy plastovou sítí. Nádoba se dostatečně zaizolovala parafilmem a překryla víkem. Celá izolace probíhala po dobu 7 týdnů.

Po ukončení izolace byly listy odebrány z nádoby a přesunuty do velké Petriho misky s destilovanou vodou a opláchnuty. Pomocí pinzety byly kutikuly postupně oddělovány od zbylého rostlinného materiálu a jemným štětečkem dočištěny. Světle hnědé kutikuly byly uskladněny v čisté destilované vodě.



Obr. 8: List použitý v experimentu a jeho separovaná kutikula

#### 3.4.1.2. *Chemická izolace*

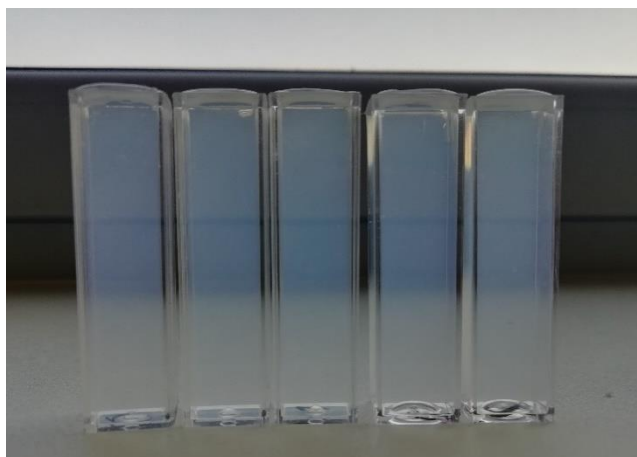
Druhým typem izolace byla poměrně rychlejší, ale také agresivnější metoda. Příprava listu probíhala stejným způsobem, jako u izolace enzymatické. Pro izolační roztok bylo použito 40 cm<sup>3</sup> koncentrované kyseliny chlorovodíkové a 70,8 g ZnCl<sub>2</sub> (exotermní reakce). Roztok i listy byly převedeny do nádoby, opět zatíženy umělohmotnou sítkou a celá nádoba byla zaizolována parafilmem a přikryta víkem.

Doporučená doba izolace byla tři dny. Bohužel za tento čas se nepodařilo mezofyl listu dostatečně rozložit a kutikuly bylo velmi obtížné separovat. Proto se listy ponechaly v nádobě s roztokem o jeden den déle.

Po izolaci se kutikuly opláchly v destilované vodě a k separaci od rozložených částí listu bylo opět využito pinzety a štětečku, aby došlo k co nejmenšímu poškození kutikul. Čisté kutikuly se uskladnily v nádobě s destilovanou vodou.

#### 3.4.2. *Příprava difúzního média*

K přípravě difúzního média byla využita 1% agaróza a plastových PMMA kyvet. Do každé kyvety bylo potřeba vždy cca 8 cm<sup>3</sup> roztoku. K přípravě deseti kyvet bylo tedy potřeba namíchat roztok o 80 cm<sup>3</sup> destilované H<sub>2</sub>O a 0,8 g práškové agarózy. Směs bylo třeba zahřáta minimálně na 85 °C, aby došlo ke správnému zesílení gelu. Gel byl nalit do kyvety tak, aby vždy přesahoval její horní hranu, a to z důvodu zabránění vysychání gelu během přípravy vzorků s kutikulou.



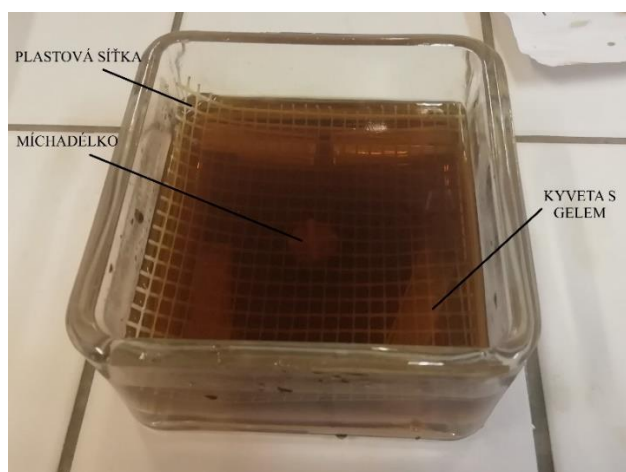
Obr. 9: Čistý agarózový hydrogel

Po zatuhnutí gelu byla přesahující část seříznuta s hranou kyvety pomocí skalpelu a na kyvetu se šetrným způsobem nanasla kutikula. Na kyvetě se kutikula opatrně upravila, aby nebyla pokrčená a přiléhala ke gelu. Kutikula se následně přichytila pomocí parafilmového pásku a uložila do nádoby s roztokem lignohumátu. Tímto způsobem byly na gel nanесeny všechny kutikuly chemické i enzymatické izolace.

### 3.4.3. Aplikace do roztoku

Jako médium nesoucí lignohumát byl zvolen roztok o koncentraci 0,1 % hm LH v objemu 250 cm<sup>3</sup>. Bylo naváženo 0,25 g LH, převedeno do odměrné baňky a baňka byla doplněna destilovanou vodou po rysku. Roztok byl nalit do nádoby s kyvetami. Pro každé měření byla přichystána jedna nádoba a obsahovala 4 nebo 5 kyvet, podle toho, kolik se podařilo izolovat kutikul.

Do nádoby bylo přidáno míchadélko, kyvety byly přichyceny plastovou sítkou, aby držely u dna a celá nádoba se důkladně zaizolovala parafilmem, přikryla víkem a umístila na magnetickou míchačku. Byl zaznamenán čas přípravy.



Obr. 10: Nádoba připravená k transportu LH

### 3.4.4. Měření

Samotné měření transportu LH do gelu se provádělo na UV-VIS spektrometru, a to v rozsahu 200 až 900 nm. Vlnová délka absorbovaného záření HL byla vymezena pro 465 nm. Po dobu 5 až 10 dnů se vzala vždy jedna nádoba a odebral se parafilm se sítkou. Pomocí pipety byl do tří čistých kyvet převezen roztok a bylo změřeno jeho absorpční spektrum.

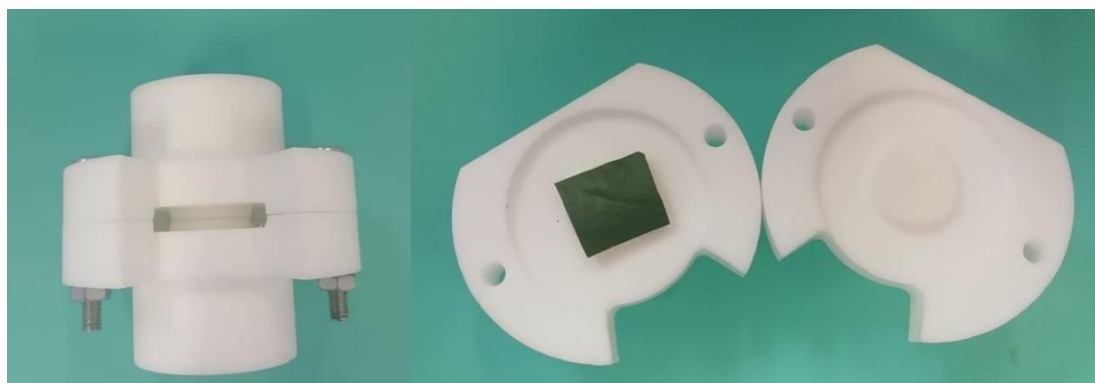
*Měření kyvet s gelem:* z kyvety byla odebrána kutikula, byla osušena a očištěna. Aby bylo možné změřit absorbanci gelu v celé délce kyvety, bylo za potřeby využít speciálního posuvného nástavce, který se umístil do spektrometru. Ten umožňoval nastavit požadovanou pozici, ve které byla absorpční spektra měřena. Pozic bylo celkem 23. V prvních šesti pozicích se nástavcem posouvalo po 1 mm od hrany kyvety směrem dolů, aby bylo možné naměřit co nejpodrobněji vstupní oblast, kde LH difundoval do gelu. Další pozice se posouvali už o 2 mm, a to až do konce kyvety. Vždy byl zaznamenán čas měření.

## 3.5. Transport lignohumátu do listů

K prostudování transportu do listového prostoru byly zvoleny stejné listy z rostliny *Bobkovišeň lékařská*, aby bylo možné dosažené výsledky navzájem porovnat. Byly vypracovány dvě různé metody experimentu. Obě jsou založeny na sledování úbytku koncentrace LH v roztoku v závislosti na čase.

### 3.5.1. Příprava vzorků listů a roztoků

Pro sledování listů bylo zapotřebí zajistit změřitelnou plochu jeho kontaktu s roztokem. Proto bylo využito speciální formy, pomocí které byly okrajové části listu zapuštěny do pryskyřice. Tím bylo docíleno stálé plochy, na níž mohl být roztok aplikován. Plocha listu  $S_L = 1,86 \text{ cm}^2$ .



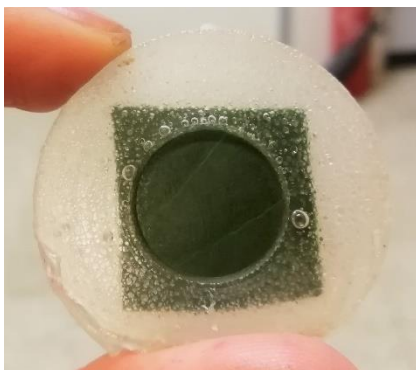
Obr. 11.: Forma pro zapuštění listu do pryskyřice

List byl důsledně očištěn v destilované vodě, pomocí skalpelu byla vyříznuta plocha, která přesahovala středovou oblast formy (Obr. 11). Tato část listu byla ve formě uzavřena. Okraje bylo nutné obalit parafilmem, aby nedošlo k vylití roztoku pryskyřice.

Bylo naváženo 2,75 g suché složky a 2,25 g roztoku. Na přípravu pryskyřice byly využity toxické sloučeniny, proto bylo nutné s nimi pracovat ve větraném prostředí. Celá směs byla pak



promíchána a opatrně nalita do formy s připraveným listem. Pryskyřice se nechala zatuhnout v digestoři s odtahem po dobu několika hodin.



Obr. 12: List zapuštěný v pryskyřici

Jelikož bylo potřeba na list aplikovat roztok, bylo nutné vzorek z formy ještě dále upravit. Pomocí dvou kruhových vykrajovátek a pryskyřice byla vytvořena okolo listu miska. Kruhová vykrajovátka byla potřena silikagelem, aby je bylo možné po zatuhnutí opět odebrat. Umístila se na již připravený vzorek, a mezi ně se vlila pryskyřice (v poměru 11:9 pro suchou a kapalnou složku). Bylo nutné takto přichystanou novou formu okamžitě zatížit, aby nedošlo k vytečení nezatuhlé pryskyřice na plochu listu a znehodnocení vzorku. Opět se nová forma nechala pár hodin zatuhnout.



Obr. 13: Kruhová vykrajovátka na přípravu formy (nalevo) a zatížená forma s pryskyřicí (napravo)

Po zatuhnutí se vykrajovátka odebrala a forma se očistila od zbylého silikagelu pomocí vatové buničiny. Takto byla forma i s listem připravena pro experiment. Do vytvořené misky byly převedeny vždy  $2\text{ cm}^3$  roztoku LH.



Obr. 14: Vzhled výsledné formy

### 3.5.2. Metoda s odpařováním roztoku

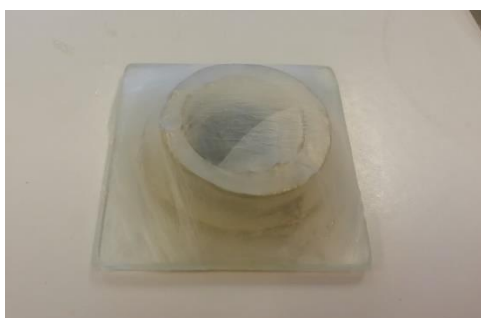
Při první metodě se využívaly roztoky 0,1 a 0,5 % (hm.) LH. Roztok byl ve formě s listem uložen v laboratorních podmínkách k odpaření. Celý odpar (2 ml roztoku) trval 3 dny. Po vysušení roztoku bylo možné na povrchu listu pozorovat tenkou hnědou vrstvičku (Obr. 15). Ta byla rozpouštěna za občasného promíchání v nových 2 cm<sup>3</sup> destilované vody po dobu 20 až 30 min. Když se LH ve vodě rozpustil, pomocí spektrometru bylo změřeno absorpční spektrum roztoku. Po změření byl použitý roztok do formy navrácen a nechán další tři dny k odpaření.



Obr. 15: Vzhled listu po odpaření roztoku

### 3.5.3. Metoda s parafilmem

U druhé metody se používaly roztoky 0,05, 0,1 a 1% LH. Roztok byl po nalití do formy zaizolován parafilmem a po dobu jednoho týdne uložen v laboratorních podmínkách bez další manipulace. Poté byl parafilm odebrán a bylo změřeno absorpční spektrum roztoku. Po měření byl původní roztok opět navrácen do formy, ta byla zakryta parafilmem a uložena dalších sedm dní pro další měření.



Obr. 16: Forma s parafilmem

### 3.6. Diskuze a výsledky měření

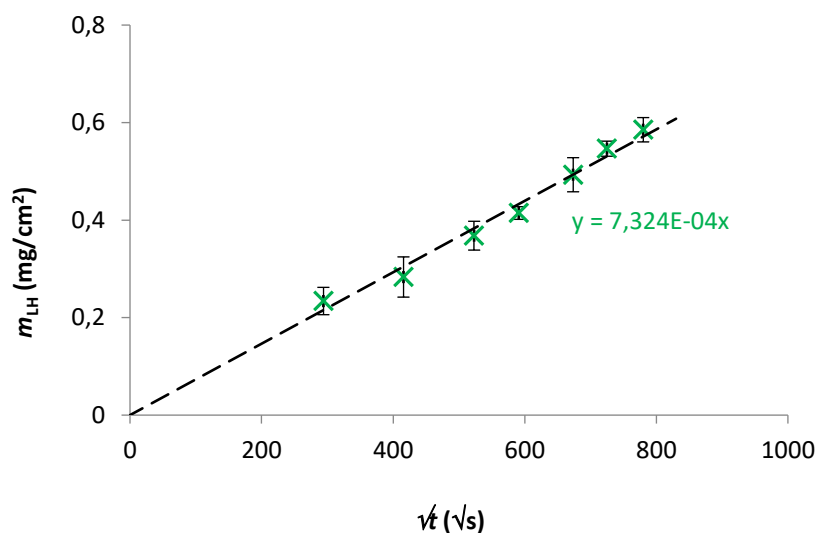
#### 3.6.1. Příprava vzorků

Kutikuly byly separace enzymatickou a chemickou izolací od mezofylu. Jak již bylo řečeno, enzymatická izolace je poměrně mírná metoda, a to se projevilo i na pevnosti získaných kutikul. Naopak po chemické izolaci byly kutikuly značně náchylnější k přetrhnutí, proto bylo k dispozici celkově menšího počtu kutikul k experimentu. Vzhledově se od sebe kutikuly získané různými metodami nelišily, v obou případech se jednalo o světle hnědé, průsvitné blány.

Po separaci následovalo jejich rozdělení na abaxiální (spodní) a adaxiální (svrchní) stranu. K tomu byl využit optický mikroskop. Oba typy kutikul bylo možné od sebe odlišit díky zřetelně pozorovatelným stomatům, nacházejícím se pouze na spodní kutikule.

#### 3.6.2. Transport skrz kutikulu

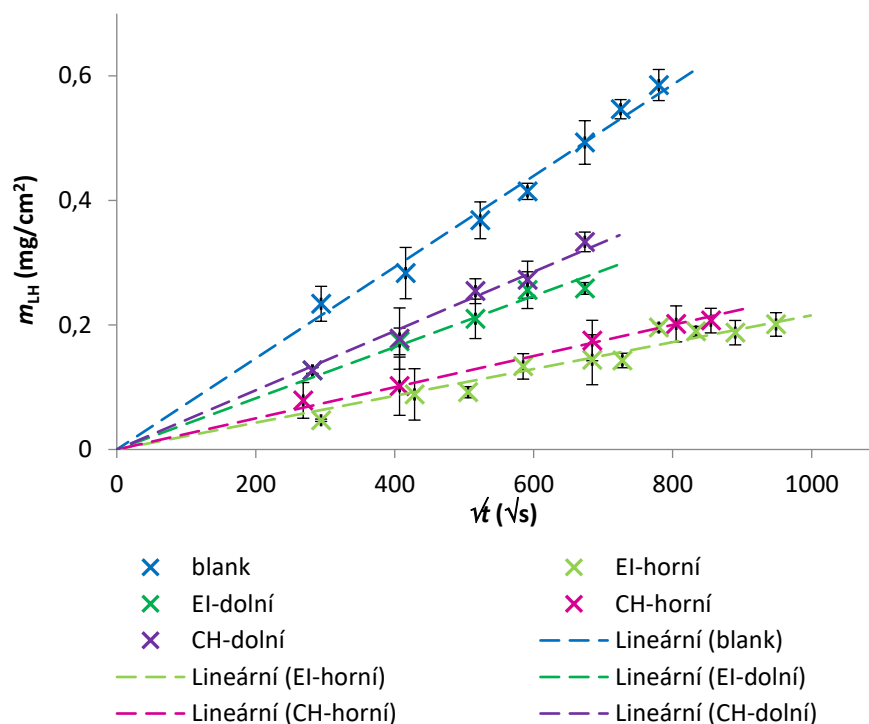
Pro stanovení difúzního toku na fázovém rozhraní roztok-gel byly připraveny tzv. „slepé vzorky“. Jednoprocentní agarózové gely v kyvetách byly vloženy do 0,1% (hm.) roztoku LH bez přítomnosti kutikul. LH tedy neměl žádnou transportní bariéru a difúze byla závislá čistě na schopnosti látky přejít z roztoku do gelu.



Obr. 17: Difúzní tok lignohumátu z roztoku do gelu v závislosti na odmocnině z času

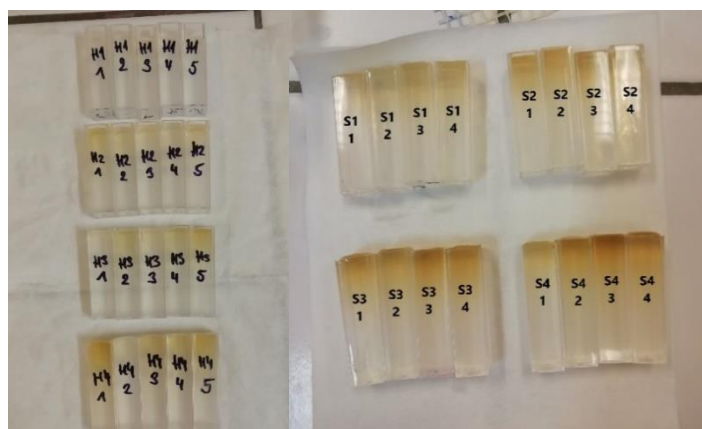
Na Obr. 17 pozorujeme růst celkového toku s přibývajícím množstvím difundovaného LH do gelu. Výsledná závislost potvrzuje difúzi ve směru koncentračního gradientu a složí pro porovnání s experimenty transportu skrz kutikulu.

Pro sledování schopnosti kutikuly transportní proces ovlivnit byla na rozhraní roztok-gel vložena kutikula a byla pozorována změna difúzního toku. Měření byla rozdělena na chemickou (CHI) a enzymatickou (EI) izolaci pro spodní a horní kutikuly. Závislosti jednotlivých měření byly vyneseny do společného grafu.



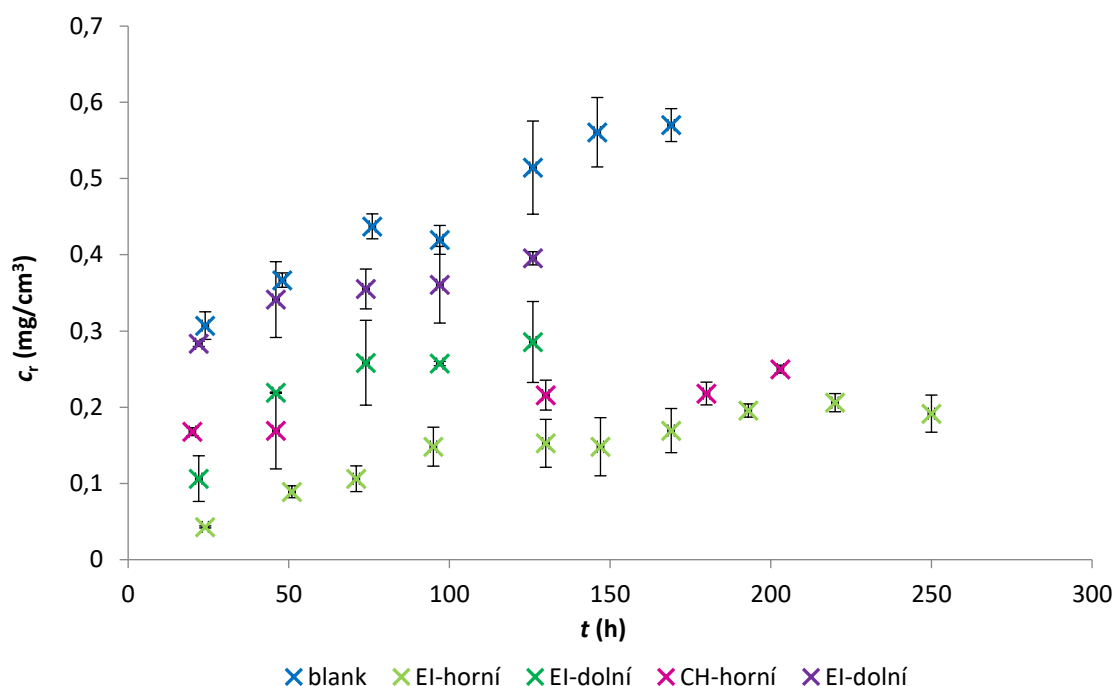
Obr. 18: Závislost  $m_{LH}$  na  $t^{(1/2)}$  pro všechna měření transportu skrz kutikulu

Při pohledu na Obr. 18 je možné hned pozorovat, že při slepých vzorcích (blank) prostoupilo do gelu největší množství LH v porovnání s ostatními experimenty a křivka celkového toku je zde nejstrmější. Dále bylo potvrzeno, že přítomnost kutikuly značně ovlivňuje průchod LH do gelu. Do jaké míry je kutikula schopná látky propouštět je z velké míry dáno její kondicí. Pokud porovnáváme CHI a EI, tak k většímu toku lignohumátu nastalo u izolace chemické. Což odpovídá skutečnosti, že se jedná o invazivnější metodu, která kutikulu více rozrušila. To se projevilo na jejích omezených separačních schopnostech a průchod skrz kutikulu byl pro HL jednodušší a efektivnější než u izolace enzymatické. Při porovnávání spodní a svrchní kutikuly se jako více účinný tok ukázal u kutikul spodních. Zde se projevila přítomnost stomat, které umožnily výrazně snadnější průchod látek do gelu.



Obr. 19: Vizuální porovnání difúzních procesů u horních (H) a spodních (S) kutikul prvních 4 měření

Důležitým parametrem toku LH je koncentrace na difúzním rozhraní roztok-gel. Hydrogel v kyvetách se postupně obohacoval o lignohumát, a naopak koncentrace v roztoku klesala. Zajímavým poznatek byla naměřená rostoucí koncentrace LH na rozhraní gelu.



Obr. 20: Rostoucí koncentrace na rozhraní gelu v čase  $t$  pro všechna měření transportu skrz kutikulu

Z toho důvodu byla vypočítána koncentrace hypotetická, kterou by fázové rozhraní mělo, kdyby k nárůstu koncentrace nedocházelo. K výpočtu bylo využito difúzního koeficientu transportu HL gelem ( $D = 1,539 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ ) z bakalářské práce *Transport huminových látek skrz rostlinnou kutikulu* [31]. Výsledná hypotetická koncentrace odpovídá přibližně střední hodnotě naměřených koncentrací.

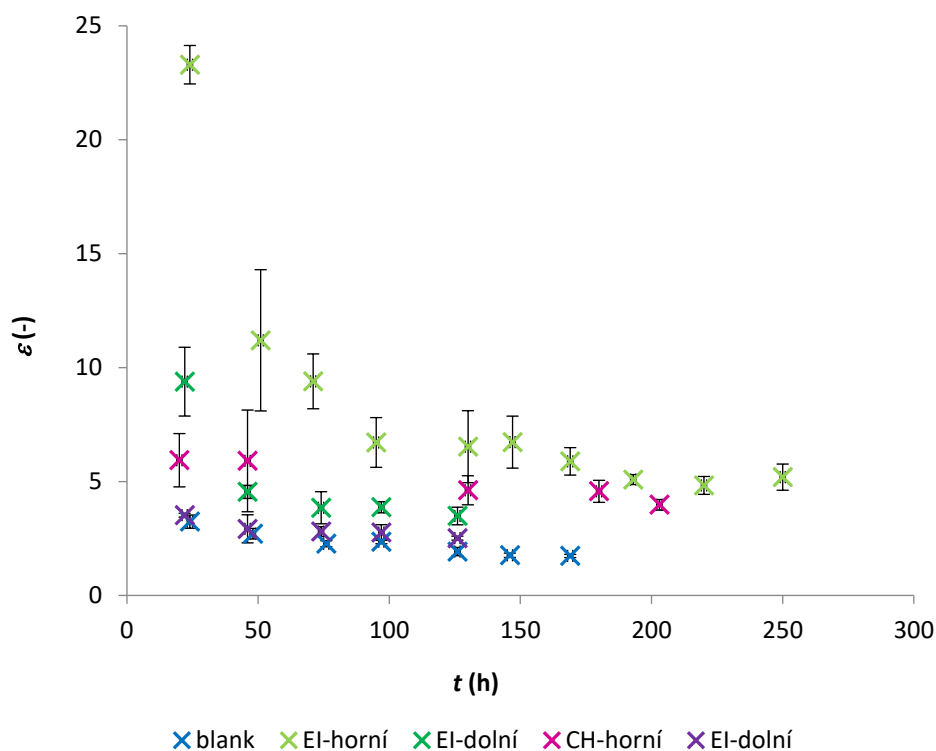
Tabulka 2: Hypotetické koncentrace jednotlivých měření

měření	blank	EI-horní	CHI-horní	EI-spodní	CHI-spodní
$c_H [\text{mg}/\text{cm}^3]$	0,523	0,154	0,179	0,294	0,340

Nejvyšší množství LH bylo transportováno u slepých vzorků, což představuje i nejvyšší  $c_H$ , naopak nejnižší koncentrace byla vypočítána pro horní kutikuly enzymatické izolace, které vykazovaly nejlepší bariérové vlastnosti. Stanovené hypotetické koncentrace nám zde slouží jako ukazatel míry odporu vytvořeného kutikulou.

Možnost, že by se koncentrace na rozhraní roztok-gel později ustálila se nevylučuje. Například u EI horních kutikul, kdy bylo provedeno měření nejvíce je možné sledovat snižující se změnu koncentrace s přibývajícím časem. Ověření této hypotézy by vyžadovalo další experimenty.

Hydrogel se postupně o lignohumát obohacoval, a naopak koncentrace roztoku klesala. Vlivem neustálého míchání roztoku, byla v daném čase koncentrace v celém objemu stejná. Porovnání této koncentrace s koncentrací na rozhraní gelu ukazuje, že zde dochází k jejich skokové změně. Koncentrační skok je charakterizován jejich poměrem  $\epsilon$  (Obr. 21).



Obr. 21: Poměr ( $c_{ROZTOK}/c_{GEL}$ ) v čase  $t$

Poměr koncentrací u všech měření klesá s časem a systém spěje k ustálení rovnováhy. Znovu se zde projevuje vliv kutikuly, a to ve stejném pořadí, jako tomu bylo u difúzních toků na Obr. 18.

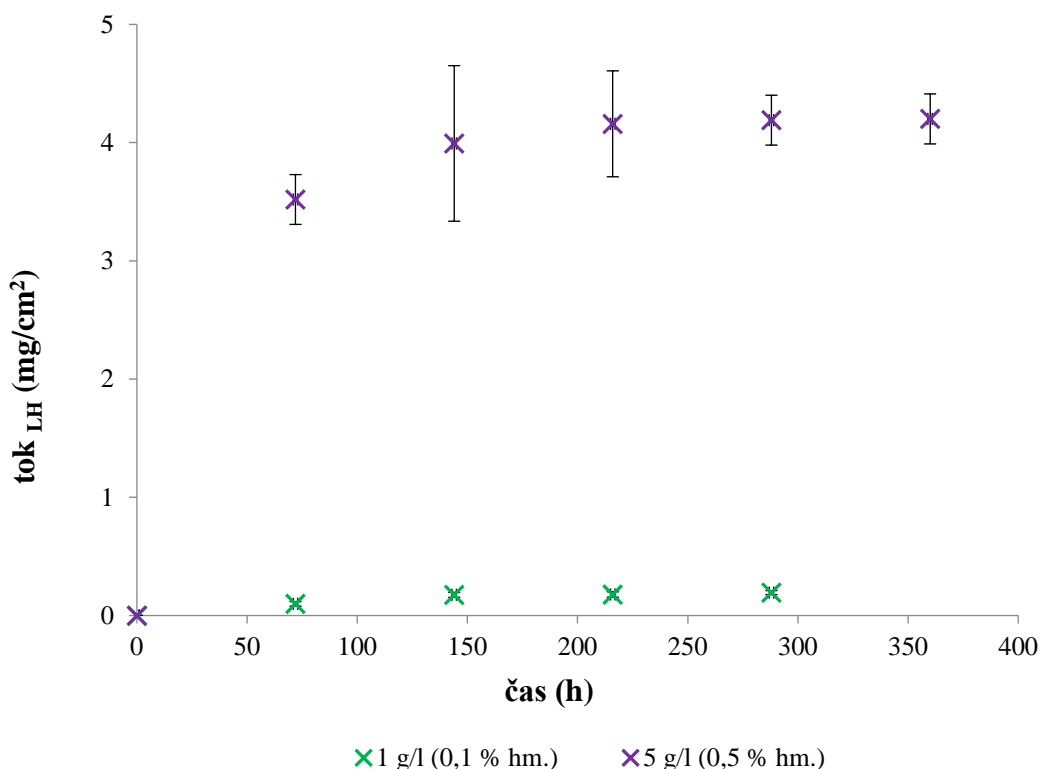
### 3.6.3. Transport do listu

Při experimentech bylo prvotním záměrem ověřit difúzi LH do listů a zjistit, zda jsme schopni transport změřit. Přímé pozorování listů pomocí spektrofotometrický metod bylo vyloučeno, s předpokladem, že při měření fluorescence HL by docházelo k fluorescenci samotného listu. Proto se pozorovaným činitelem stal roztok, aplikovaný přímo na listovou plochu.

Měřením absorpčních spekter a kalibrační závislosti byl vypočítán úbytek množství LH v roztoku. Podle rovnice (3) víme, že jednotlivé toky na obou stranách se rovnají a můžeme tedy předpokládat, že odevzdané množství látky z roztoku, bylo přijato listem.

### Metoda s odpařováním:

Při této metodě byly napodobeny podmínky foliární aplikace roztoku huminových látek v praxi, kdy se část naneseného roztoku absorbuje a zbytek odpaří. Na plochu  $S_L$  byly nanесeny 2 ml roztoku, odpaření trvalo v laboratorních podmínkách 3 dny. Zbylé, neabsorbované množství LH zůstalo na povrchu a vytvořilo tmavě hnědou suchou vrstvu. Rozpuštěním této vrstvy vznikl nový roztok o nižší koncentraci.

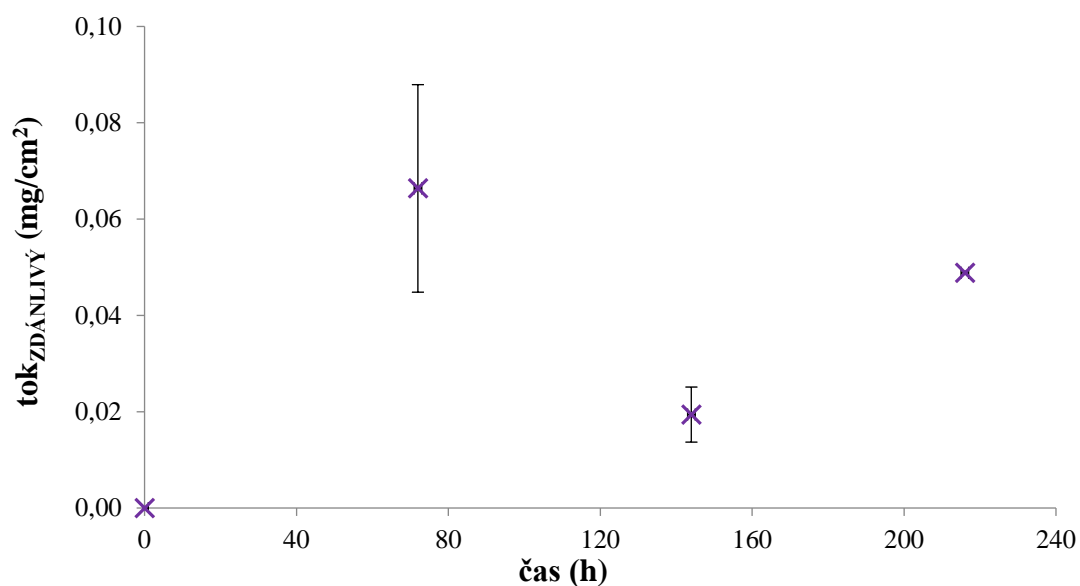


Obr. 22: Graf toku lignohumátu v závislosti na čase při metodě s odpařováním roztoku

Měřením ukázalo, že množství difundované látky závisí na její koncentraci v roztoku. Při vyšší koncentraci byl výsledný difúzní tok LH daleko větší, a to především během 1. týdne měření. Při měření téhož vzorku po delších časových úsecích bylo pozorováno, že množství LH již z roztoku neubývá, spíše zůstává konstantní a mezi listem a roztokem dochází k ustálení rovnováhy.

Otázkou zůstává, zda by rovnováha difúze nastala i při aplikaci na živou rostlinu, neboť rostlina si je schopná pomocí vodivých pletiv transportovat živiny na místo potřeby, tudíž by množství schopné difundovat do listu bylo pravděpodobně vyšší a závislé na výživovém deficitu rostliny. Tak či onak v reálných podmínkách udržet hnojivo na listu po delší časový úsek by bylo značně obtížné a pravděpodobně by bylo smyto vláhou.

Pro ověření výsledných spekter byly připraveny nové vzorky, které neobsahovaly roztok LH, ale na list byla aplikována pouze destilovaná voda (2 ml). Cílem toho měření bylo zjistit, zda nedochází k uvolňování jiných, pro nás nežádoucích, látek z listu do roztoku. Tento tok byl nazván jako zdánlivý.



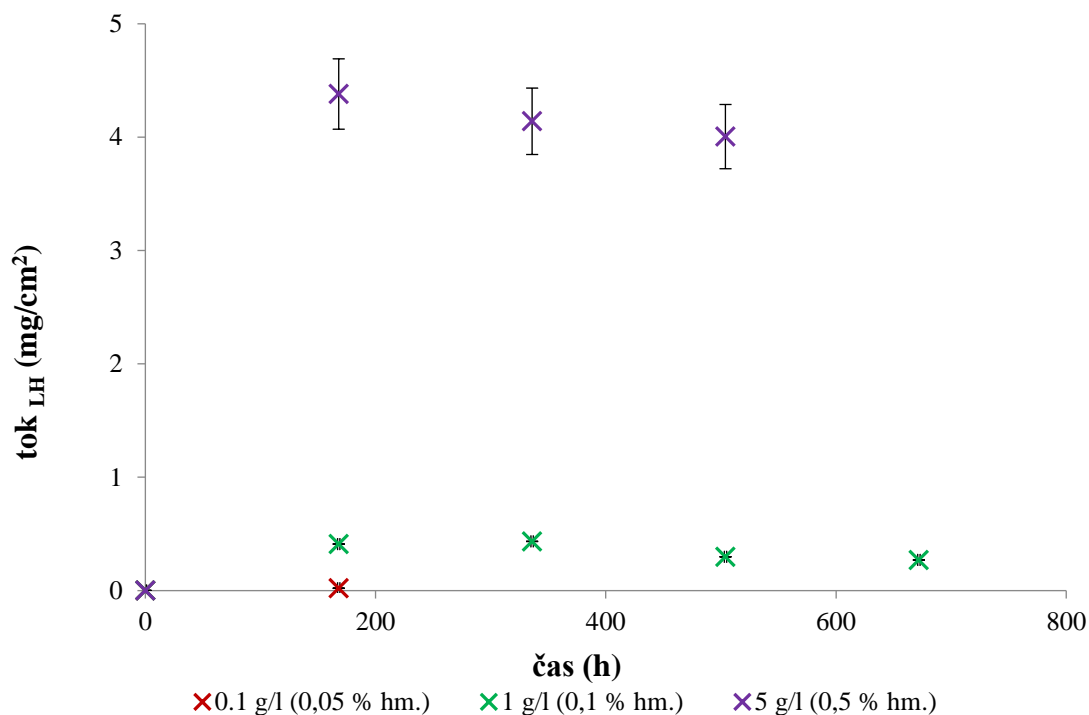
Obr. 23: Graf difúzního toku látek uvolněných z listu do roztoku při metodě s odpařováním

V grafu pozorujeme, že k vyluhování neznámých látek s absorbcí ve stejných vlnových délkách dochází. Jedná se však o velmi nízké a nestálé hodnoty, které by mohly mít vliv pouze na velice zředěné roztoky LH.

#### *Metoda s parafilmem:*

Vzhledem k tomu, že nám nebylo známo, jaký vliv má úplné vysušení roztoku na huminovou sloučeninu, byla zvolena ještě druhá metoda, jak difundované množství do listu pozorovat. Roztok byl ve vzorku zaizolován parafilmem a nechal se probíhat difúzní děj bez dalších okolních vlivů.

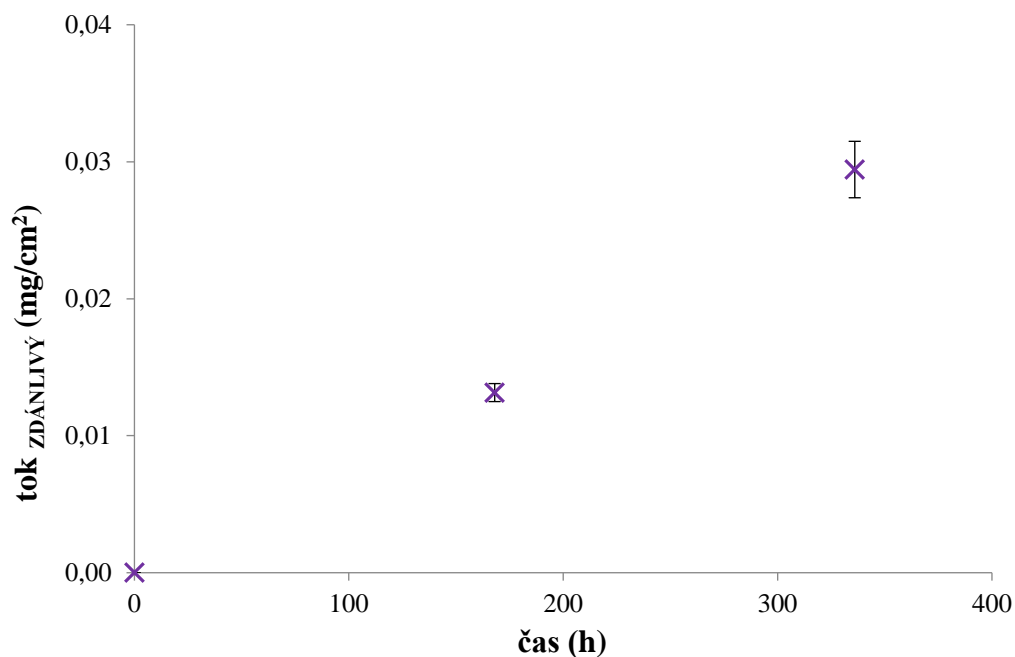




Obr. 24: Graf toku lignohumátu v závislosti na čase při metodě s parafilmem

Měřením této metody jsem dosáhly velice podobných výsledků, jako u odpařování roztoku. Došlo tedy k průniku největšího množství hned ze začátku procesu, načež se později ustálila rovnováha. Výsledné hodnoty difúzních toků ale byly naměřeny vyšší. Z toho nám vyplývá, že transportní proces je efektivnější v podmínkách za stálé přítomnosti vody, kdy je kutikula nabobtnaná a difúzní proces je tím usnadněn.

Parafilm však není ideální izolant, proto se v průběhu experimentu začala forma s roztokem vážit, aby se ověřilo, zda nedochází k odpaření vody skrz parafilm a tím pádem i k zakonzentrování roztoku LH. Nepatrný úbytek hmotnosti zaznamenán byl, a to okolo 0,05 g, vzniklá změna je velice malá a vliv na výsledná absorpční spektra měla minimální.

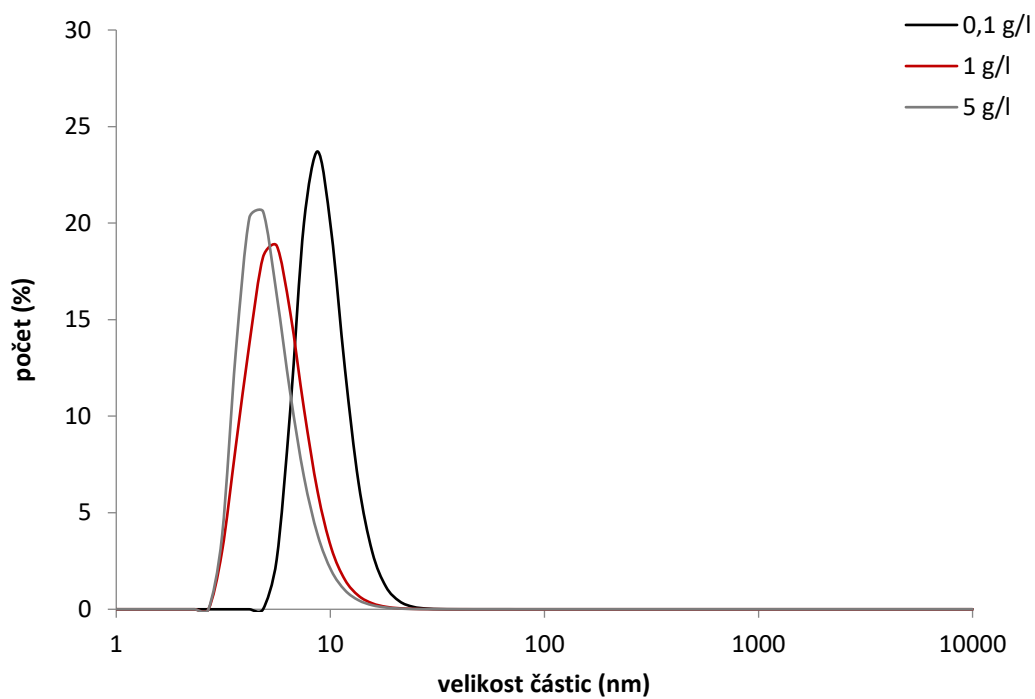


Obr. 25: Graf difúzního toku látek uvolněných z listu do roztoku při metodě s parafilmem

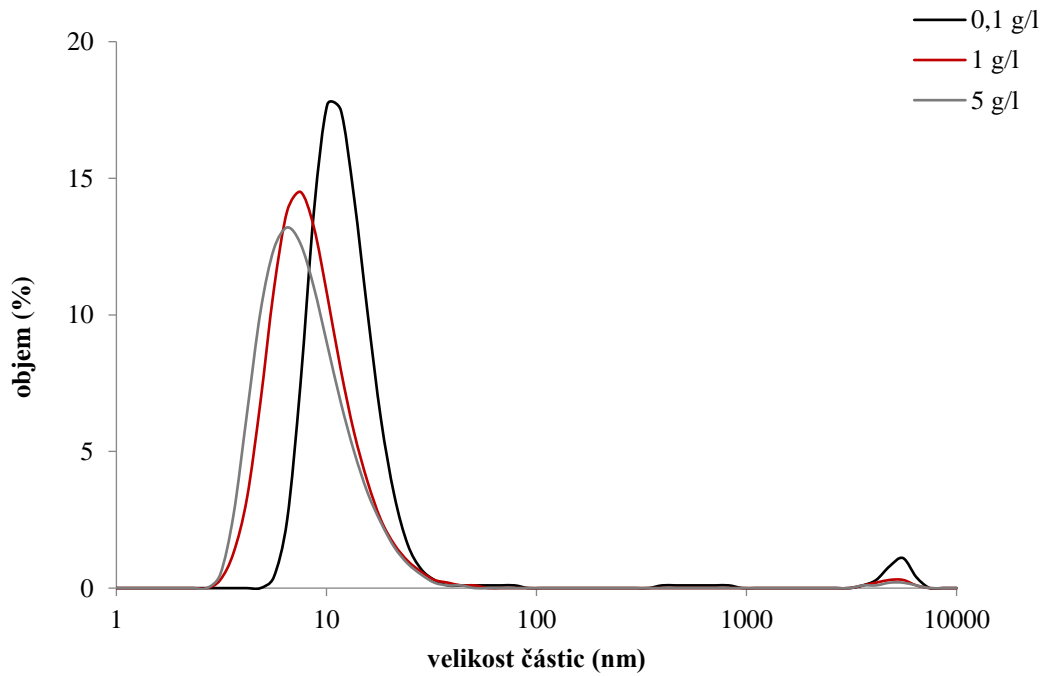
Stejně tak byl změřen zdánlivý tok látek uvolněných z listu do roztoku, jako o předešlé metody. Výsledné hodnoty se ukázaly být ještě nižší, než u odpařování roztoku a viditelný vliv mohly mít pouze na koncentraci 0,05 % (hm.) LH.

### 3.7. Distribuce velikosti částic

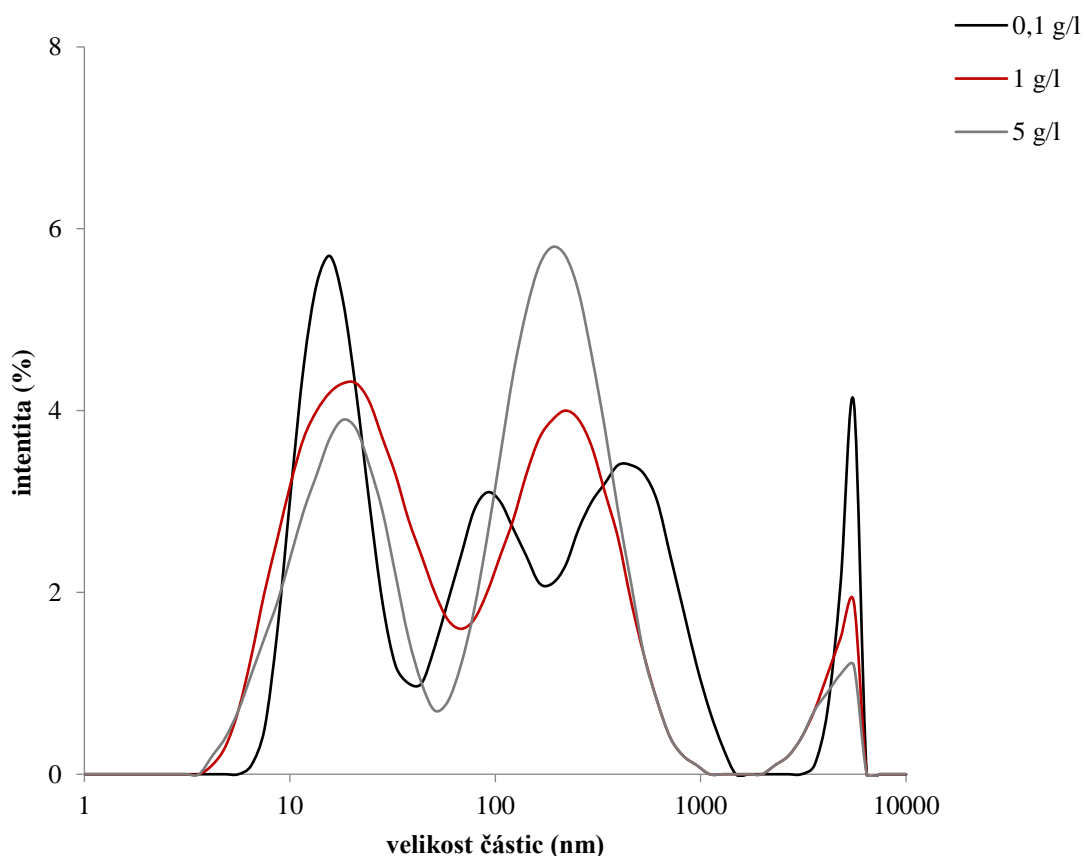
Huminové látky jsou směs molekul o různých velikostech, a jejich molární hmotnost se dá jen s těžší určit. Pomocí metody DLS (Dynamic light scattering) byla určena distribuce velikostí HL pro koncentrace použité v experimentech. Distribuční závislost huminových látek byla měřena pomocí rychlosti fluktuace intenzity rozptýleného světla. Výsledkem testu je distribuce velikostních tříd v závislosti na relativní intenzitě. Tu je pak dále možné převést na distribuci objemu a distribuci počtu částic.



Obr. 26: Početní distribuce velikosti částic lignohumátu ve vodě



Obr. 27: Objemová distribuce velikosti částic ve vodě



Obr. 28: Intenzivní distribuce velikosti částic lignohumátu ve vodě

Z intenzivní distribuce je možné vypožorovat, že velikostní třídy v roztocích jsou poměrně rozmanité. Zastoupené rozměry se pohybují jak v desítkách, tak stovkách až tisících nanometrů. Početní distribuce HL u použitých koncentrací nám však prozrazují, že větších částic se v roztoku nachází velmi málo. Koncentrace 0,1 a 0,5 % (hm.) LH se od sebe příliš neliší. Velikosti částic se pohybují okolo 10 nm a jsou zastoupené poměrně ve stejném množství. Ale přeci jen je možné pozorovat, že při nižší koncentraci 0,05 % (hm.) LH se v roztoku vyskytuje částic nepatrně více, a to i o větší velikosti. Podobný výsledek byl naměřen pro distribuci objemovou. Částice koncentrovanějších roztoků zabírají menší objem, než u roztoku 0,1 g/l. Oproti početní distribuci se zde projevuje i zastoupení částic o velikosti 1 či 10  $\mu\text{m}$ .

Z distribučních křivek je vidět, že velikosti HL v použitých roztocích se pohybují převážně v oblasti desítek nm, v nepatrném zastoupení o velikosti vyšší. Pokud se vrátíme k agarzovému gelu, velikost jeho pórů byla stanovena na 18  $\mu\text{m}$ . Také pomocí optického mikroskopu a programu uEyeCockpit byly v diplomové práci [8] stanoveny průměrné rozměry stomat pro chemickou izolaci na  $14,1 \times 5 \mu\text{m}$  a enzymatickou izolaci na  $13,0 \times 7 \mu\text{m}$ . Ze zmíněných dat lze vyvodit, že molekuly HL jsou dostatečně malé a jsou schopny difundovat skrz průduchy a póry gelu bez příliš velkého odporu. Do jaké míry je selektivní samotná kutikula pro větší molekuly HL nám zatím známé není.

## 4. ZÁVĚR

Práce byla zaměřená na studování transportu huminových látek do listů, jakož to důležitým faktorem pro jejich využití při foliárním hnojení. Sledovaným parametrem při experimentech se stala změna koncentrace lignohumátu v jeho roztoku, způsobená difúzním tokem dovnitř listu. Vyhodnocovací metodou byla zvolena UV-VIS spektrofotometrie pro vlnovou délku absorbance huminových látek 465 nm. Výsledkem měření byl popis difúzních procesů. Snahou co nejvíce napodobit skutečné podmínky foliárního hnojení a objasnit transport živin, byly zvoleny dvě oblasti zkoumání využívající modelu difúze v páru nekonečných médií.

První oblast se zaměřovala na samotnou kutikulu, svrchní voskovitou vrstvu listu, regulující celý transport. Pomocí již zavedených a optimalizovaných metod, chemické a enzymatické izolace, byla separována od listového mezofylu a podrobena experimentům sledujících její schopnost ovlivnit difúzní proces. Bylo potvrzeno, že vliv, jakým kutikula propouští HL je závislý na stavu použité kutikuly. Chemická izolace kutikulu více rozruší, neboť se jedná o drastičtější metodu a získané kutikuly jsou podstatně jemnější a citlivější. Proto difúzní tok lignohumátu byl naměřen větší pro tuto metodu než pro mírnější enzymatickou izolaci. Další velký vliv na prostup HL má přítomnost stomat na abaxiální straně kutikuly. Stomata jsou oproti huminovým látkám poměrně velkých rozměrů. Umožňují tak lepší a rychlejší penetraci látek, než propustí kutikula samotná.

Druhá oblast se soustředila již na celý průřez listu a k jakému transportu dochází, když jsou přítomné všechny jeho složky (tedy i mezofyl). Byly zvoleny dva experimenty, které měly simulovat nanesení kapalného hnojiva na plochu listu. Nejdříve se roztok lignohumátu nechal z listu odpařit, stejně jako tomu je při podmínkách hnojení v zemědělství. Důležitým faktorem pozorování bylo množství lignohumátu absorbované listem vůči zbylému množství na jeho povrchu. Výsledky ukázaly závislost transportu na koncentraci použitého roztoku. Do listu difunduje při vyšší koncentraci i vyšší množství HL a následně dochází k ustálení rovnováhy mezi roztokem a listem. Při transportu tedy nedochází k naplnění jakési nutriční kapacity ovlivněné výživovým deficitem listu, ale systém vždy míří k rovnováze. Stejných výsledků bylo docíleno u druhého experimentu, kdy roztok z listu nebyl odpařován, nýbrž ponechán ve stabilním stavu po celou dobu difúze. Opět došlo k transportu LH v prvních dnech pokusu a následně systém směřoval k rovnováze. Při porovnání obou experimentů bylo možné pozorovat, že při odpařování roztoku z povrchu listu dochází k menšímu přenosu látek a difúzní tok je méně efektivní. Kapalně prostředí má totiž na průnik látek do listu pozitivní vliv, kutikula bobtná a umožňuje tak lepší přenos živin. Bohužel udržení stále vlhkého prostředí při foliárním hnojení v zemědělství je značně ekonomicky náročnějším procesem. Přirozená vláhla ve formě dešťů může sice zaschlý postřík opět rozpustit, kutikulu nabobtnat a umožnit tak další transport výživy, přináší však i negativní efekt, a to riziko úplného smytí aplikovaného hnojiva.

Pokud bychom chtěli porovnat způsoby transportu huminových látek skrz kutikulu a do listu, zaměříme se na koncentraci 0,1 % (hm.) lignohumátu, která byla použita v obou experimentech. Při transportu látek do listu se využívalo penetrace pouze přes adaxiální stranu listu. Z grafů celkových toků lignohumátu do listů (Obr. 22 a Obr. 24) se pro koncentraci 1 g/l tok LH pohybujeme v rozmezí 0 až 0,2 mg/cm<sup>3</sup> pro metodu s odpařováním a v rozmezí

0 až 0,4 mg/cm<sup>3</sup> pro metodu s parafilmem. V grafu toků pro transport skrz kutikulu na Obr. 18 se toky naměřily v rozmezí 0 až 0,2 mg/cm<sup>3</sup>, a to v obou případech izolace. Oba experimenty nám poskytují srovnatelné výsledky. Transportu skrz kutikulu do hydrogelu se zde jeví méně efektivní i když k difúzi docházelo skrz nabobtnanou kutikulu ve vodném prostředí. Průchod gelem je tedy pro huminové látky náročnější než mezofylem listu. Obě metody se ale jeví jako vhodnou simulací reálných podmínek foliárního hnojení.

Touto bakalářskou prací byla prokázána možnost pozorování transportu huminových látek do listů a dala potenciál dalšímu prohloubení znalostí transportu huminových látek. Experimenty dále mohou směřovat do různých oblastí, jak se zaměřením na podrobnější popis difúzního procesu, tak na studování velikosti prošlých částic lignohumátu a selektivitě kutikuly.

## 5. ZDROJE

- [1] PITTER, Pavel. *Hydrochemie*. 5. aktualizované a doplněné vydání. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2015. ISBN 978-80-7080-928-0.
- [2] KLUČÁKOVÁ, Martina. *Humínový svět pohledem fyzikální chemie: Physico-chemical view on humic world : teze přednášky k profesorskému jmenovacímu řízení v oboru Fyzikální chemie*. Brno: VUTIUM, 2014. ISBN 978-80-214-4945-9.
- [3] POSPÍŠILOVÁ, Lubica. *Nedegradací metody studia kvality přírodních humusových látek: Non-degradation methods of studying natural humic substances quality : původní vědecká práce*. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2012. Folia Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis. ISBN 978-80-7375-662-8.
- [4] KOLÁŘ, Ladislav, Jan MOUDRÝ a Marek KOPECKÝ. *Humus*. Náměšť nad Oslavou: ZERA - Zemědělská a ekologická regionální agentura, o.s., 2014. ISBN 978-80-87226-34-6.
- [5] SOTÁKOVÁ, Soňa. *Organická hmota a úrodnost půdy*. Bratislava: Příroda, 1982. Rastinná výroba (Příroda).
- [6] HOFRICHTER, Martin, et al. *Biopolymers: Lignin, Humic Substances and Coal*. 1. vydání. Weinheim, New York, Chichester, Brisbane, Singapore, Toronto: Wiley-VCH, 2001. 523 s. ISBN 978-3-527-30220-8.
- [7] RICHTER, Rostislav a Jaroslav HLUŠEK. *Průmyslová hnojiva, jejich vlastnosti a použití*. Praha: Institut výchovy a vzdělávání Ministerstva zemědělství ČR, 1996. Rostlinná výroba (Institut výchovy a vzdělávání Ministerstva zemědělství ČR). ISBN 80-7105-121-7.
- [8] LAŠTŮVKOVÁ, Marcela. *Studium transportu huminových látek skrz rostlinné kutikuly*. Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická, 2014, 94 l. : il.
- [9] NOVÁK, Jan a Milan SKALICKÝ. *Botanika: cytologie, histologie, organologie a systematika*. Čtvrté vydání. Praha: Powerprint, 2017. ISBN 978-80-7568-036-5.
- [10] KINCL, Miloslav a Václav KRPEŠ. *Základy fyziologie rostlin*. 3., dopl. vyd. Ostrava: Václav Krpeš, 2006. ISBN 80-239-8375-X.
- [11] VANĚK, Václav, Jiří BALÍK, Milan PAVLÍK, Daniela PAVLÍKOVÁ a Pavel TLUSTOŠ. *Výživa a hnojení polních plodin*. Praha: Profi Press, 2016. ISBN 978-80-86726-79-3.
- [12] VOTRUBOVÁ, Olga. *Anatomie rostlin*. 3., přeprac. vyd. Praha: Karolinum, 2010. ISBN 978-80-246-1867-8.
- [13] RICHTER, Rostislav. Ústav agrochemie a výživy rostlin, Mendelova Univerzita v Brně. [online]. 2004. Dostupné z: [http://web2.mendelu.cz/af\\_221\\_multitext/vyziva\\_rostlin/html/prijem\\_zivin/prijem\\_mi\\_mokorenovy.htm](http://web2.mendelu.cz/af_221_multitext/vyziva_rostlin/html/prijem_zivin/prijem_mi_mokorenovy.htm)
- [14] TRČKOVÁ, Marie, Ivana RAIMANOVÁ a Pavel SVOBODA. *Listová výživa obilnin: uplatněná certifikovaná metodika*. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2009. ISBN 978-80-7427-030-7.
- [15] MAREK, Michal V., Otmar URBAN a Irena MARKOVÁ. *Fyziologie rostlin pro lesní inženýry*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2008. ISBN 978-80-7375-228-6.

- [16] FELLNEROVÁ, Ivana. Výukový materiál zpracovaný v rámci Projektu „Aktivní začlenění SŠ pedagogů do tvorby a využití multimediálních výukových programů ve výuce biologie“ CZ.04.1.03/3.2.15.2/0270. [online]. Dostupné na: <http://atraktivnibiologie.upol.cz/>
- [17] ORGELL, W. H. *The Isolation of Plant Cuticle with Pectic Enzymes*. Plant Physiology. 1955, r. 30, č. 1. DOI: 10.1104/pp.30.1.78.
- [18] SCHREIBER, Lukas a Jörg SCHÖNHERR. Water and solute permeability of plant cuticles: measurement and data analysis. Springer, 2009. ISBN 35-406-8945-1.
- [19] EDGINGTON, L., BUCHENAUER H., GROSSMANN F. a J. SCHÖNHERR. *Bioassay and transcuticular movement of systemic fungicides*. Pesticide Science. 1973, r. 4, č. 5, IV-1-752. DOI: 10.1016/b978-0-08-023930-9.50166.
- [20] HRVOLOVÁ, Barbora. *Biofyzika*. Ostrava: Vysoká škola báňská - Technická univerzita Ostrava, 2013. ISBN 978-80-248-3105-3.
- [21] VEJRAŽKA, Martin. Wikiskripta. [online] 2006. Dostupné na: [https://www.wikiskripta.eu/w/Elektrofor%C3%A9za\\_nukleov%C3%BDch\\_kyselin](https://www.wikiskripta.eu/w/Elektrofor%C3%A9za_nukleov%C3%BDch_kyselin)
- [22] VLASÁK, Jan. *Transportní vlastnosti agarózových hydrogelů*. Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická, 2015, 51 stran . : ilustrace
- [23] STEVENSON, F. J. *Humus chemistry: genesis, composition, reactions*. New York. John Wiley a Sons, Inc. 1994. ISBN 04-715-9474-1.
- [24] Katedra experimentální biologie rostlin, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy. [online]. 2014. Dostupné z: [http://kfrserver.natur.cuni.cz/lide/zelen/U3V\\_fr/prezentace/2014/05\\_transport.pdf](http://kfrserver.natur.cuni.cz/lide/zelen/U3V_fr/prezentace/2014/05_transport.pdf)
- [25] BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠIŠKOVÁ. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. Vyd. 5., přeprac. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005. ISBN 80-7080-579-X.
- [26] SANI, Bezhad. *Foliar Application of Humic Acid on Plant Height in Canola*. Teheran: APCBEE Procedia, 2014, 8, 82–86.
- [27] ZARGAR, Mesisam, Tumanyan, A., Ivanenko, E., Dronik, A., Tyutyuma, N., & Pakina, E. *Impact of foliar fertilization on apple and pear trees in reconciling productivity and alleviation of environmental concerns under arid conditions*. Communicative & Integrative Biology, 2019, 1-9.
- [28] CRANK, John. *The Mathematics of diffusion*. Oxford: Clarendon Press, 1956.
- [29] CUSSLER, E. L. *Diffusion, mass transfer in fluid systems*. New York: Cambridge University Press, 1984. ISBN 052123171X.
- [30] KLUCAKOVA, Martina a M. PEKAR. *Transport of copper(II) ions in humic gel – new results from diffusion couple*, Colloid. Surface. A, 349 (2009) 96-101
- [31] HÝVNAROVÁ, Lucie. *Transport huminových látek skrz rostlinnou kutikulu*. Brno, 2019. Dostupné na: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/113545>.  
Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Martina Klučáková